ESA
1945

Ano 1940

Tomo 35

Fasciculo 2

IMP. INST. INT.
— LIBRARY —
27 AUG 1945
SERIAL
C.S.A.7
p.411 Werner
+ Thompson
sep. raid 21/a

MEMORIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Rio de Janeiro - Brasil

INDICE

(Julho – Setembro, 1940)

MARTINS, AMILCAR, VERSIANI, VALDEMAR e TUPÍNAMBÁ, ANTONIO — Estudos sobre a Tripanosomiase americana em Minas Gerais, Brasil. 285

PACHECO, GENESIO e COSTA, GOBERT ARAUJO — Ação do oxigenio sob pressão sobre a ação patogenica dos germens anaerobios..... 303

PACHECO, GENESIO e COSTA, GOBERT ARAUJO — Produção de H^2S pelos Clostridios anaerobios 311

OLIVEIRA, LEJEUNE P. H. DE e MOREIRA, CICERO A. — Estudos sobre os elementos figurados do sangue do crustaceo *Uca pugnax* (Smith) var. *brasiliensis* Oliveira (Decapoda: Ocypodidae)..... 317

CHAGAS, A. W. — Criação de flebotomos e transmissão experimental da Leishmaniose visceral americana..... 327

DIAS, EMMANUEL — Técnica do xenodiagnostico na molestia de Chagas.... 335

NEIVA, ARTHUR e LENT, HERMAN — Estudos sobre Triatomideos do Chile: Interessante caso de provavel polimorfismo..... 343

PACHECO, GENESIO e COSTA, GOBERT ARAUJO — Comentario ao esquema de classificação das Salmonellas de Kauffmann-White..... 365

OLIVEIRA, LEJEUNE P. H. DE — Contribuição ao conhecimento dos crustaceos do Rio de Janeiro. Catalogo dos crustaceos da Baía de Guanabara (continúação)..... 375

OLIVEIRA, LEJEUNE P. H. DE — Sobre uma nova especie de crustaceo *Chthamalus rhizophorae* n. sp. (Chthamalidae: Cirripedia)..... 379

PACHECO, GENESIO e COSTA, GOBERT ARAUJO — A capacidade sulfidrigena (produção de H^2S) é uma propriedade geral das bacterias heterotroficas..... 381

DIAS, EMMANUEL — Sobre um *Schizotrypanum* dos morcegos *Lonchoglossa ecaudata* e *Carollia perspicillata* do Brasil..... 399

WERNECK, FABIO LEONI e THOMPSON, GORDON B. — Sur les mallophages des marsupiaux d'Australie (Mallophaga: Boopidae)..... 411

CUNHA, ARISTIDES MARQUES DA e FREITAS, GILBERTO DE — Ensaio monografico da familia *Cyathodiniidae*..... 457

As **MEMORIAS,** orgão oficial do Instituto Oswaldo Cruz, são reservadas exclusivamente á publicação de trabalhos originais nele realizados e aparecerão, em fasciculos, em Março, Junho, Setembro e Dezembro.

Toda a correspondencia deverá ser dirigida á:

REDAÇÃO DAS MEMORIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ
CAIXA POSTAL 926
RIO DE JANEIRO — BRASIL

MEMORIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo 35 Ano—1940 Fasciculo 2

SERVIÇO DE ESTUDO DAS GRANDES ENDEMIAS
Superintendente: Dr. E. Chagas

(Trabalho do Instituto Biológico Ezequiel Dias)
Diretor: Prof. Otávio Magalhães

Estudos sobre a Tripanosomiase americana em Minas Gerais, Brasil *

pelos

Drs. Amilcar Martins, Valdemar Versiani e Antonio Tupinambá

(Com 4 gráficos no texto e 1 estampa)

A presente publicação representa um resumo da atividade que desde outubro de 1937 vimos desenvolvendo, no sentido de concorrer com uma pequena parcela para um conhecimento mais amplo da doença de Chagas.

Estimulados pelo novo impulso que ultimamente vêm tendo os trabalhos sobre esta doença, não só no Brasil como em varios outros paises sul-americanos, tinhamos inicialmente o intuito de coligir apenas

* Recebido para publicação a 14 de Fevereiro de 1940 e dado á publicidade em Julho de 1940.

alguns dados que nos permitissem esboçar a distribuição das diferentes especies de Triatomideos nas diversas zonas do Estado de Minas Gerais e, no mesmo passo, estabelecer a sua percentagem de infecção pelo *Schizotrypanum cruzi*.

Estas pesquisas, frequentemente interrompidas pela interferencia de outros trabalhos, foram conduzidas dentro do restrito objetivo inicial, até outubro do ano passado, época em que tivemos oportunidade de relatá-las ao Dr. Evandro Chagas, Chefe da Comissão de Estudos sobre as Grandes Endemias. Este, interessado pelo plano dos trabalhos, propôs-nos fosse o mesmo ampliado, de modo a se enquadrar no serviço que dirige, articulando-se com trabalho identico a ser executado em outros Estados.

De acôrdo com as sugestões do Dr. Evandro Chagas, o trabalho passou então a obedecer ao seguinte plano:

PLANO GERAL PARA O ESTUDO DA TRIPANOSOMIASE AMERICANA EM MINAS GERAIS

1.º — Trabalho de campo.

2.º — Trabalho de laboratorio.

1.º — a) Localização das pesquisas em zonas tipicas do Estado:

1.º — Zona central (em torno de Belo Horizonte).
2.º — Zona norte (vale do São Francisco).
3.º — Zona oéste (Araxá).
4.º — Zona léste (Teófilo Otoni).
5.º — Zona sul.
6.º — Zona da Mata.

b) Em cada zona, realização das seguintes pesquisas:

1.º — Determinação das espécies de barbeiros ocorrentes.
2.º — Determinação da densidade de barbeiros.
3.º — Determinação do indice de infecção dos barbeiros.
4.º — Xeno-diagnóstico em 250 individuos da espécie humana.
5.º — Xeno-diagnóstico em 50 exemplares de cada uma das espécies predominantes de mamiferos silvestres.
6.º — Exame do sangue (gôta espessa) de todos os individuos da espécie humana e mamiferos silvestres nos quais foi feito o xeno-diagnóstico.
7.º — Exame do sangue em gôta espessa de 200 animais domesticos (cães e gatos).

8.º — Verificação da incidencia percentual de alterações do ritmo do coração.

9.º — Determinação da incidencia percentual do bocio.

10.º — Determinação da incidencia de sindromas de diplegia cerebral.

11.º — Isolamento de raças de *Schizotrypanum cruzi,* humanas e de animais silvestres.

12.º — Verificação das condições climáticas e topográficas, de fauna e flora.

2.º — As pesquisas de laboratório deverão ser planejadas em detalhe, depois de instalado e em funcionamento o serviço de campo. Devem ter os seguintes objetivos:

1.º — Determinação do poder patogenico, para animais de laboratório, das raças de diversas procedencias.

2.º — Verificação da capacidade de transmissão de cada uma das espécies de barbeiros.

3.º — Determinação das variações do poder patogenico de raças de *Schizotrypanum cruzi* de diferentes procedencias, pela passagem nas diversas espécies de barbeiros.

* * *

Deste plano, cuja completa execução demanda tempo mais dilatado, pretendemos expor os resultados obtidos na pequena parte já realisada, que se refere unicamente ao nosso projéto inicial, isto é, á distribuição e percentagem de infecção dos triatomideos em Minas Gerais.

O material de estudo, que monta, até o presente, a 7.300 barbeiros, foi obtido mediante captura efetuada pessoalmente pelos autores, em várias excursões pelo interior do Estado, e, em sua maior parte, por meio de circulares distribuidas entre médicos, organizações sanitarias, professores, prefeitos municipais e fazendeiros do interior. Em alguns casos, recorremos tambem à compra de barbeiros efetuada por preços variáveis, conforme sua procedencia.

Os pedidos endereçados aos Diretores de Grupos Escolares e Escolas Reunidas e às professoras de escolas isoladas foram grandemente facilitados pela intervenção do Sr. Diretor do Departamento de Educação do Estado, que nos prestou eficaz colaboração. As escolas primarias constituiram para nós uma ótima fonte de abastecimento de barbeiros, podendo dizer-se que nosso trabalho contou com a cooperação de centenas de professores e escolares do interior do Estado.

Para a correspondencia com os prefeitos municipais obtivemos valioso auxilio do Departamento de Assistencia aos Municipios.

Técnica empregada — Em todos os insétos foi examinado o conteúdo do intestino posterior, obtido, na quasi totalidade dos casos, pela introdução no réto de uma pipeta capilar. Em casos raros, onde não era possivel a execução deste processo, recorria-se à dissecção do inséto. A principio, praticávamos igualmente a dissecção dos barbeiros no caso de um primeiro exame negativo, porém verificámos que a constante concordancia de resultados tornava desnecessario o emprêgo deste método.

Tratando-se de barbeiros mortos, facilitava-se a introdução da pipeta pela secção da extremidade posterior do animal.

As fézes assim conseguidas eram emulsionadas em uma gôta de solução fisiológica e examinadas a fresco, entre lamina e laminula, com ocular 7 e objetiva 40 Zeiss. Era feita sómente uma preparação para cada exemplar. A experiencia nos mostrou que para um resultado seguro basta o exame cuidadoso de uma só lamina.

Preferimos o exame a fresco por acharmos nêle varias vantagens sobre as preparações coradas, salientando-se a grande economia de tempo e de material, que não é de se desprezar, quando se trata de um numero avultado de exames. Acresce ainda a maior facilidade em se encontrar o flagelado vivo e movendo-se no campo microscópico. Por todas essas razões, deixámos de lado as preparações coradas, que eram sistematicamente feitas no inicio de nossos trabalhos. Foi igualmente abandonada, por desnecessária e mesmo impraticavel em trabalho de maior vulto, a prática de inoculação das fézes dos casos positivos em cães novos e cobaias, a qual era sempre observada no começo dos trabalhos.

Os insétos mortos eram naturalmente desprezados quando chegavam já sêcos.

* * *

Os resultados dos exames foram anotados com os necessários detalhes de procedencia do material, data e nome do remetente, assim como a espécie, o sexo e a fáse de desenvolvimento do triatomideo. Nos resultados positivos, julgámos desnecessário assinalar as diferentes fórmas evolutivas do *Schizotrypanum cruzi* encontradas, por não oferecer maior interesse tal informe.

No periodo de dois anos e três meses, examinámos 7.300 exemplares de triatomideos, provindos de todas as zonas em que se costuma dividir o Estado de Minas: Norte, Centro, Sul, Mata, Léste, Nordéste,

Oéste, Triangulo e Noroéste. O montante de serviço abrange até agora uma área ocupada por 118 municipios, num total de 170 distritos.

* * *

Apresentamos os maiores agradecimentos ao Prof. Otávio Magalhães, Diretor do Instituto Biológico Ezequiel Dias, que em tudo facilitou o andamento dos trabalhos, assim como aos Drs. Elizeu Laborne, Diretor do Departamento de Educação do Estado, J. Castilho Junior, Diretor de Saúde Pública, e Firmino Botelho, Diretor do Departamento da Assistencia aos Municipios, cujos auxilios nos foram grandemente valiosos. Manifestamos igualmente nosso reconhecimento a todos que nos proporcionaram material de estudo, particularmente aos distintos colegas Drs. Lívio Renault, Cid Ferreira Lopes e Leví Lafetá. Neste ensejo, rendemos homenagem à memória do Dr. Mário Campos, antigo Diretor de Saúde Pública, alto e nobre espirito, de quem recebemos constante estimulo.

ESPÉCIES DE TRIATOMIDEOS EXISTENTES EM MINAS GERAIS E SUA DISTRIBUIÇÃO GEOGRAFICA

Minas Gerais é um dos Estados do Brasil mais ricos em espécies de « barbeiros ». Neiva e Pinto (1923) registravam 8 espécies existentes em Minas, que desta fórma se colocava logo após a Baía, possuidora de 10 espécies. Pinto (1925) registra ainda as mesmas 8 espécies para Minas Gerais e 11 para a Baía.

Conseguimos obter apenas 5 espécies, das 8 consignadas por Neiva e Pinto, não tendo podido encontrar 3 delas: *Triatoma chagasi* Brumpt e Gomes, *Triatoma rubrofasciata* (De Geer) e *Rhodnius domesticus* Neiva e Pinto. Em compensação, recebemos 2 espécies não registradas ainda neste Estado: *Triatoma vitticeps* (Stal) e *Eutriatoma maculata* (Erichson), e uma espécie possivelmente nova — *Rhodnius sp.*, que está sendo estudada pelo Dr. Herman Lent. Além disso, colhemos em vários pontos do Estado o *Psammolestes coreodes* Bergroth, atualmente incluido entre os triatomideos.

Dessa fórma, sóbe a 12 o número de espécie de triatomideos até agora registrados no Estado de Minas Gerais:

Panstrongylus megistus (Burm.)
Panstrongylus geniculatus (Latr.)
Eutriatoma sordida (Stal)
Eutriatoma maculata (Erichson)

Triatoma infestans Klug
Triatoma brasiliensis Neiva
Triatoma vitticeps (Stal)
Triatoma chagasi Brumpt e Gomes
Triatoma rubrofasciata (De Geer)
Rhodnius domesticus Neiva e Pinto
Rhodnius sp.
Psammolestes coreodes Bergroth

Como já afirmavam Neiva e Pinto em 1923, de todas essas espécies são mais comuns, pela ordem, *P. megistus*, *E. sordida* e *T. infestans*. As demais parecem raras ou limitadas a pequenas regiões do Estado, com exceção do *Psammolestes coreodes*, que temos encontrado com frequencia.

Recebemos exemplares de triatomideos procedentes de 120 municipios, porém, como às vêses esses exemplares chegavam às nossas mãos completamente sêcos, só foram aproveitados para pesquisa de *Schizotrypanum cruzi* os procedentes de 118 municipios, não tendo sido examinados espécimens de *P. megistus* recebidos de Alfenas e Perdões, de *E. sordida* recebidas de Brasilia, Campina Verde, Coração de Jesus, Januária e João Pinheiro, de *P. geniculatus* recebidos de Campo Formoso, Fortaleza, Francisco Sá, Pirapora e Sete Lagôas, e de *E. maculata* provenientes do municipio de Arassuai (Est. 1).

Os « barbeiros » parecem existir em todo o territorio do Estado, com exceção de pequenas áreas onde as nossas pesquisas têm sido até hoje infrutiferas. São as seguintes essas zonas « silenciosas » :

1.ª) Uma pequena área formada principalmente pelos municipios qde Ouro Preto, Conselheiro Lafaiete, Carandaí, estendendo-se para o sul até a fronteira com o Estado do Rio de Janeiro, através de Barbacena, Santos Dumont, Juiz de Fóra, Matias Barbosa e municipios visinhos. A parte norte dessa área foi percorrida pelo Dr. Lobo Leite, que apezar de pesquisas cuidadosas, aí não conseguiu encontrar « barbeiros ». Tambem o Dr. Baeta Viana não poude obter desses hematófagos na localidade de Ouro Branco, situado nessa região.

2.ª) A zona que continúa para o oeste a precedente, indo até Itajubá e Caxambú. Em Caxambú não foi possivel encontrar « barbeiros », mesmo desmanchando completamente algumas cafúas.

3.ª) A continuação para o léste da primeira zona, compreendendo a parte sul da chamada Zona da Mata, principalmente nos limites com o Estado do Rio de Janeiro. As informações que temos recebido dessa zona são concordantemente negativas, e dali não nos tem vindo ne-

nhum « barbeiro », sendo os raros insétos que nos foram enviados com esta denominação geralmente reduvidios, principalmente *Apiomerus*.

4.ª) A parte inferior do vale do Rio Doce, do municipio de Caratinga até os limites com o Espirito Santo. E' preciso notar que na parte superior do mesmo vale são os « barbeiros » extremamente abundantes.

5.ª) A maior parte da zona léste, constituida principalmente pelos municipios de Guanhães, São João Evangelista, Santa Maria do Suassui, Virginopolis, Peçanha, etc., de onde até hoje não recebemos triatomideos, mas onde acreditamos que eles existam, sendo embora pouco abundantes.

E' corrente no Estado de Minas a afirmação de que os « barbeiros » não existem em zonas florestais, e sim apenas nas zonas de campo. Já recebemos, contudo, exemplares de *P. megistus* que foram colhidos pelo Dr. Cid Ferreira Lopes, no municipio de Teofilo Otoni « em plena zona da mata », conforme informação daquele distinto colega. E a maior contribuição para o presente trabalho foi-nos fornecida pela zona formada pelos municipios de Itabira, Presidente Vargas, Antonio Dias e São Domingos do Prata, zona essa francamente florestal e coberta ainda em muitos pontos por imensas matas virgens.

Num total de 7.326 « barbeiros » examinados, 5847, ou 79,81% eram *Panstrongylus megistus*, o que mostra a absoluta predominancia desta espécie em Minas. Existe ela em todas as zonas do Estado onde já foi observada a presença de triatomideos.

Na zona sul, confrontante com o Estado de São Paulo, existe ela conjuntamente com o *Triatoma infestans*. Nas zonas norte, nordéste, noroéste, oéste e parte ocidental da zona centro, encontra-se juntamente com o *Eutriatoma sordida*. Em certas partes do Triangulo, encontram-se as três espécies *P. megistus*, *E. sordida* e *T. infestans*. Na parte mais oriental da zona centro e nas zonas léste e Mata, isto é, na parte do Estado correspondente à região das matas costeiras e, portanto, da provincia Tupí, da divisão zoogeografica de Melo Leitão, existe sómente o *Panstrongylus megistus*, que é em alguns pontos tão abundante que parece ter aí o seu centro de dispersão.

O *Triatoma sordida*, embora exista em uma grande área do Estado, parece ser muito menos abundante. Só recebemos dessa espécie 712 exemplares, isto é, 9,72% do total.

O *triatoma infestans* só existe na parte montanhosa e fria da zona Sul, limitante com o Estado de São Paulo, e em certos pontos do Trian-

gulo Mineiro, em continuação, aliás, da zona Sul. Nessa zona é a espécie predominante, coexistindo, porém, com o *P. megistus* e mesmo, em certos municipios, com o *E. sordida*. Recebemos 681 exemplares de *T. infestans*, isto é, 9,29% do total.

Só recebemos o *Triatoma brasiliensis* do municipio de Espinosa, situado no extremo norte do Estado, isto é, na zona das caatingas, ou provincia Cariri de Melo Leitão. Isto, aliás, está de acôrdo com a sua distribuição no resto do país, pois é ele, segundo Neiva e Pinto (1923), comum no nordéste do Brasil. Varios exemplares por nós recebidos foram apanhados em tócas de mocós, como já fôra assinalado por Neiva. Foram examinados 66 exemplares de *T. brasiliensis*, ou 0,90% do total.

O *Panstrongylus geniculatus* tem vasta área de distribuição em Minas Gerais, pois o temos recebido de pontos bastante distantes entre si: Fortaleza, na zona Nordéste; Francisco Sá, na zona Norte; Pirapora, Pedro Leopoldo e Sete Lagôas, na zona Centro; Formiga, na zona Oéste, e Campos Formoso, no Triangulo. Contudo, devido ao seu *habitat* natural, é dificilmente encontrado e, além disso, parece muito pouco resistente, pois a maioria dos exemplares que recebemos chegaram às nossas mãos mortos e já sêcos, não tendo sído examinados. Alguns dos exemplares por nós recebidos foram capturados em buracos de tatús, outros dentro de casas e um apanhado sobre um arbusto, longe de habitações.

O *Eutriatoma maculata* foi registrado em dois municipios, ambos no norte do Estado: Francisco Sá (antiga Brejo das Almas) e Arassuaí, num total de dois exemplares apenas.

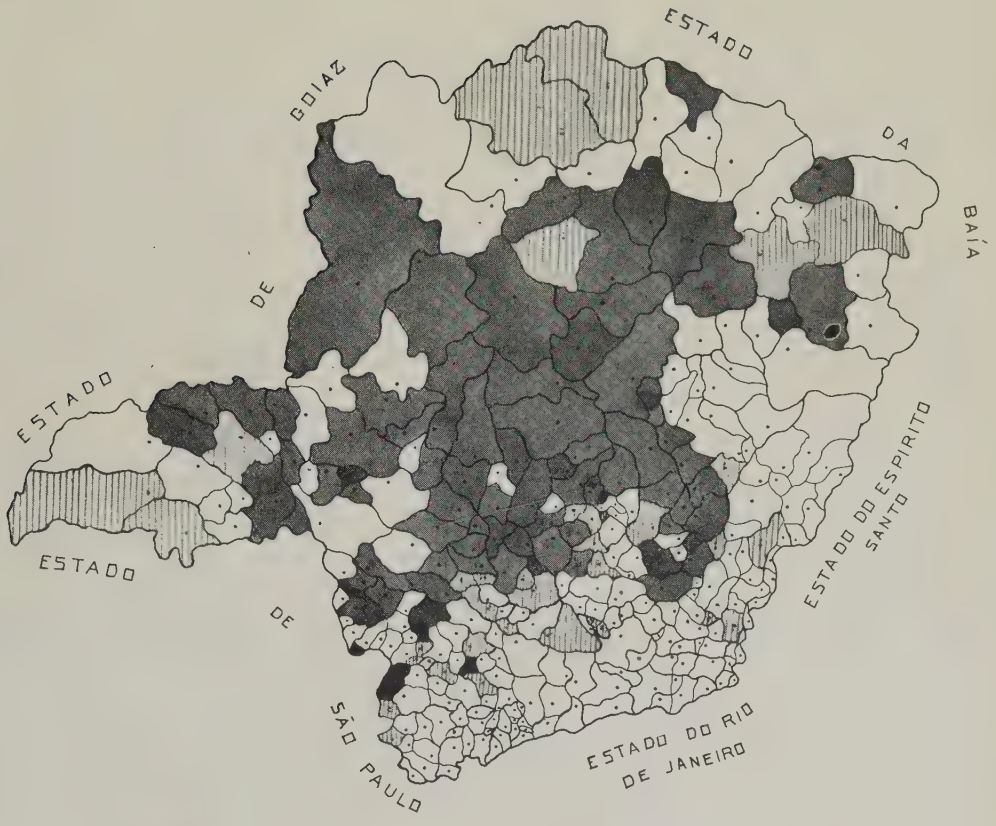
Do *Triatoma vitticeps* foram recebidos dois exemplares (macho e femea)), ambos provenientes da mesma localidade (Cachoeira do Pajeú, municipio de Fortaleza, zona Nordéste) e colhidos na mesma habitação.

Do *Rhodnius sp.* foram recebidos um exemplar de Januária e oito exemplares de Lassance, municipio de Pirapora. Esta espécie parece, portanto, limitada ao vale do São Francisco.

O *Psammolestes coreodes* é encontrado exclusivamente em ninhos do Dendrocolaptideo *Phacelodumus rufifrons rufifrons* Wied, conhecido vulgarmente por « João Gravêto », « João Tererê » ou « João Tenenem », parecendo ser bastante comum em Minas Gerais, pois foi por nós encontrado quasi todas às vêses que o procurámos. Capturámos exemplares desta espécie nos municipios de Pirapora, Presidente Vargas, Santa Quiteria, Pará de Minas e Jaboticatubas.

MEM. INST. OSWALDO CRUZ
35 (2), JUL., 1940

DISTRIBUIÇÃO DE TRIATOMIDEOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS



Municipios de onde vieram triatomideos infetados.

« « « « « não infetados.

« « « não foi recebido material.

Martins, Versiani e Tupínambá: Tripanosomiase americana.

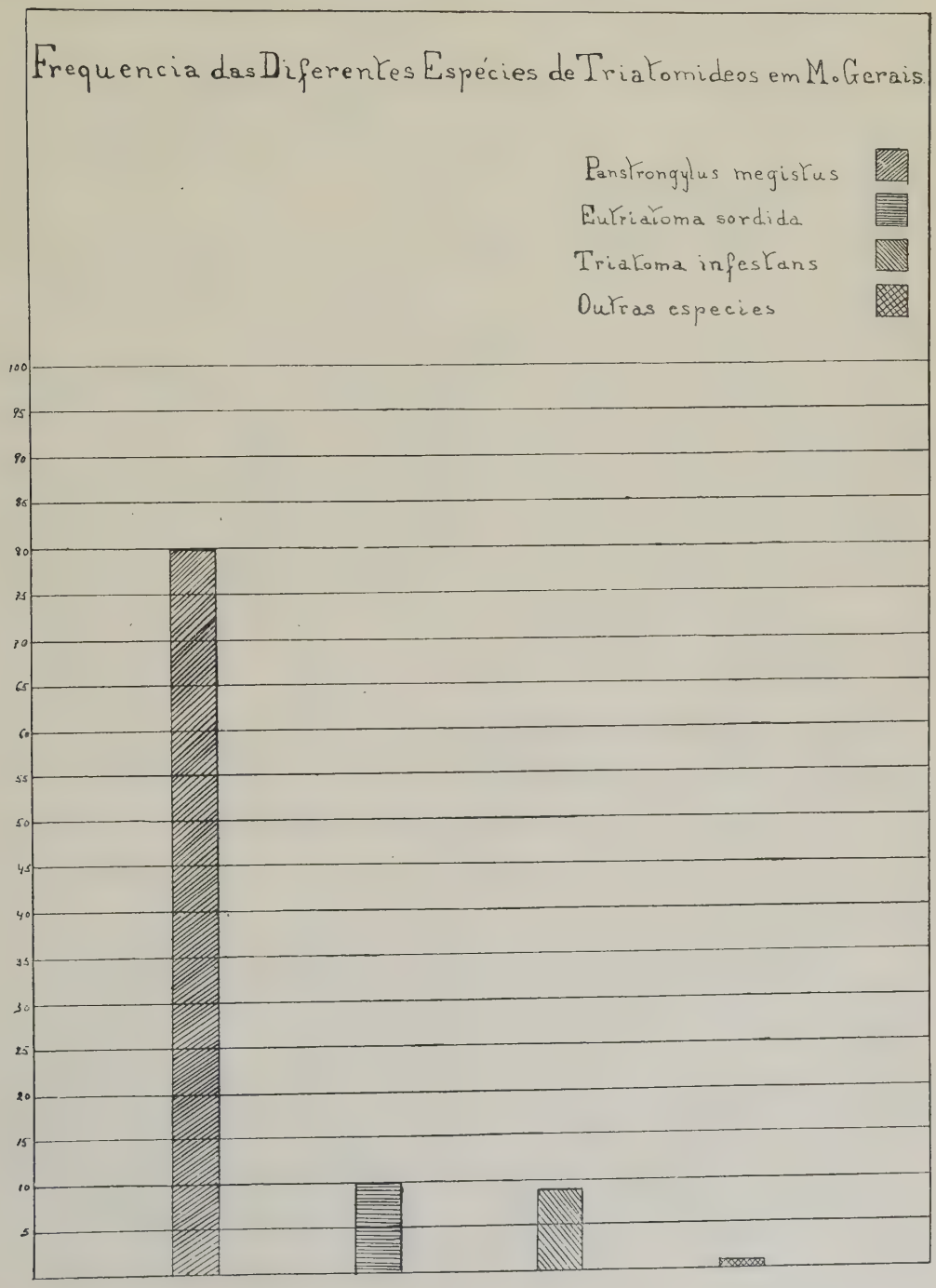

Frequencia das Diferentes Espécies de Triatomideos em M. Gerais
Panstrongylus megistus
Eutriatoma sordida
Triatoma infestans
Outras especies
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5

Gráfico 1

PERCENTAGEM DE INFECÇÃO DOS TRIATOMIDEOS EXAMINADOS

P. megistus — Como já foi dito, o maior numero de « barbeiros » recebidos pertence a esta espécie da qual examinámos 5.847 exemplares, sendo 1.308 machos, 1.486 femeas, 1.410 ninfas, e 1.643 larvas. Encontraram-se infectados 2.412, ou 41,25%, dos quais 598 machos, 683 femeas, 616 ninfas e 515 larvas.

E. sordida — Foram examinados 166 machos, 180 femeas, 172 ninfas e 194 larvas, perfazendo um total de 712 exemplares, dos quais foram positivos 47, ou 6,60%, assim distribuidos: 22 machos, 20 femeas e 5 ninfas. Não encontramos nenhuma larva infectada.

T. infestans — Examinados 681 exemplares, sendo 162 machos, 192 femeas, 140 ninfas e 187 larvas. Foram positivos 102 ou 14,97%, dos quais 41 machos, 43 femeas, 10 ninfas e 8 larvas.

T. brasiliensis — Num total de 66 exemplares, foram examinados 7 machos, 10 femeas, 24 ninfas e 25 larvas, tendo sido positivos 7 exemplares, sendo 1 macho, 2 femeas e 4 ninfas. A percentagem de infecções foi de 10,60%. Não se encontraram larvas de *T. brasiliensis* infectados.

T. vitticeps — Examinados 2 exemplares, 1 macho e 1 femea, tendo sido ambos positivos.

Rhodnius sp. — Examinaram-se 9 exemplares, sendo 4 machos, 3 femeas e 2 ninfas, todos negativos.

P. geniculatus — Examinados 8 exemplares, dos quais 3 machos, 1 femea e 4 ninfas, todos negativos.

E. maculata — Examinado 1 macho, negativo.

* * *

Resumindo, verifica-se que das três espécies mais comuns em Minas a que mais frequentemente se apresenta infectada é, conforme seria de se esperar, o *P. megistus,* com a percentagem global de 41,25%. Seguem-se o *T. infestans* que se mostra infectado em percentagem muito menor: 14,97%, o *T. brasiliensis*, com 10,60% e o E. sordida, com 6,60%. Das demais espécies o numero de exemplares examinados foi demasiado pequeno para que se possa tirar alguma conclusão. De qualquer forma não deixa de ser bastante sugestivo que os dois exemplares examinados de *T. vitticeps* estivessem infectados, o que mostra ser esse « barbeiro » um ótimo vêtor do *S. cruzi.* Como além disso é uma espécie muito facilmente cultivada em laboratório parece-nos grandemente indicada para xenodiagnostico.

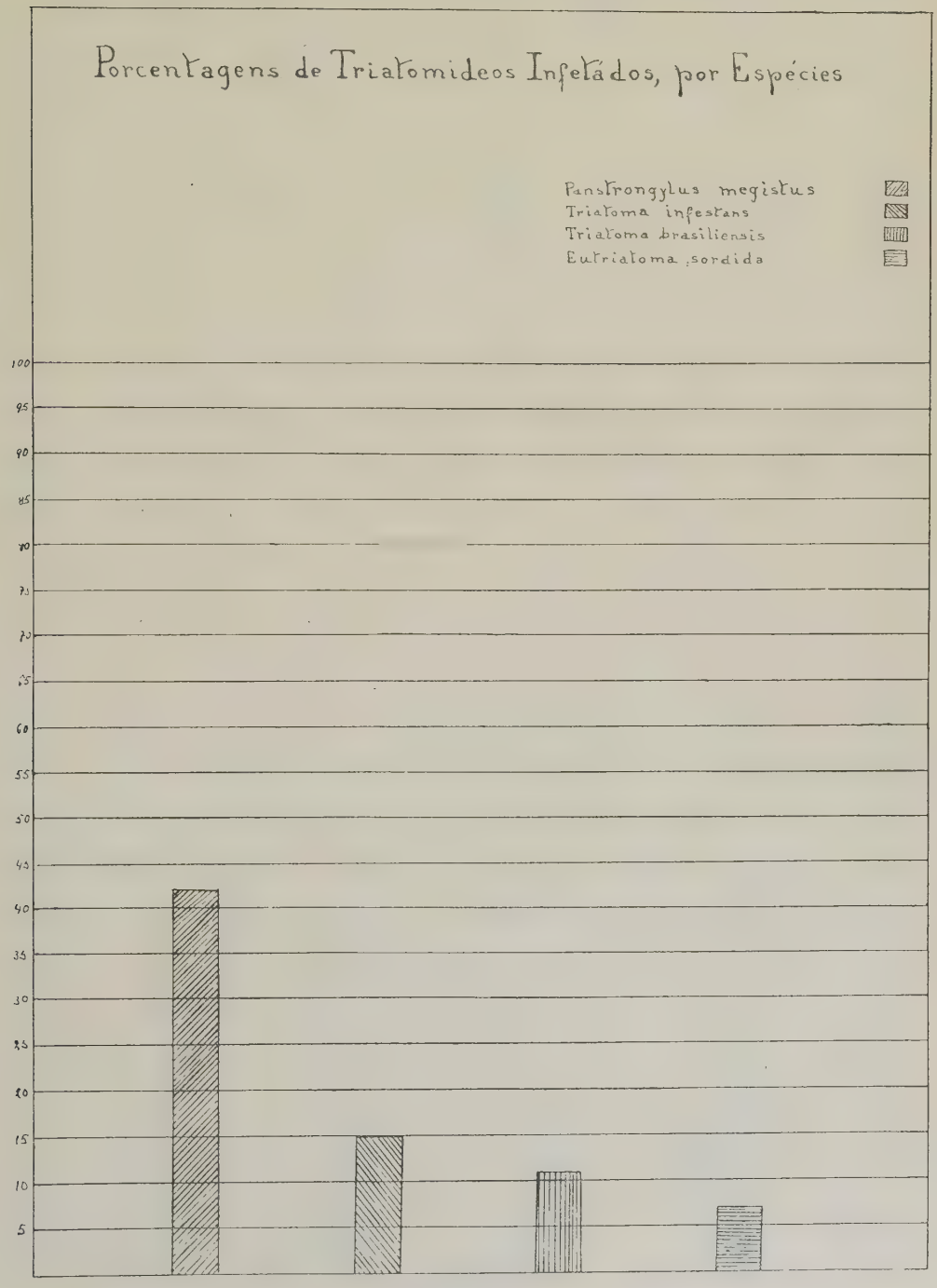

Porcentagens de Triatomideos Infetados, por Espécies
Panstrongylus megistus
Triatoma infestans
Triatoma brasiliensis
Eutriatoma sordida
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5

Gráfico 2

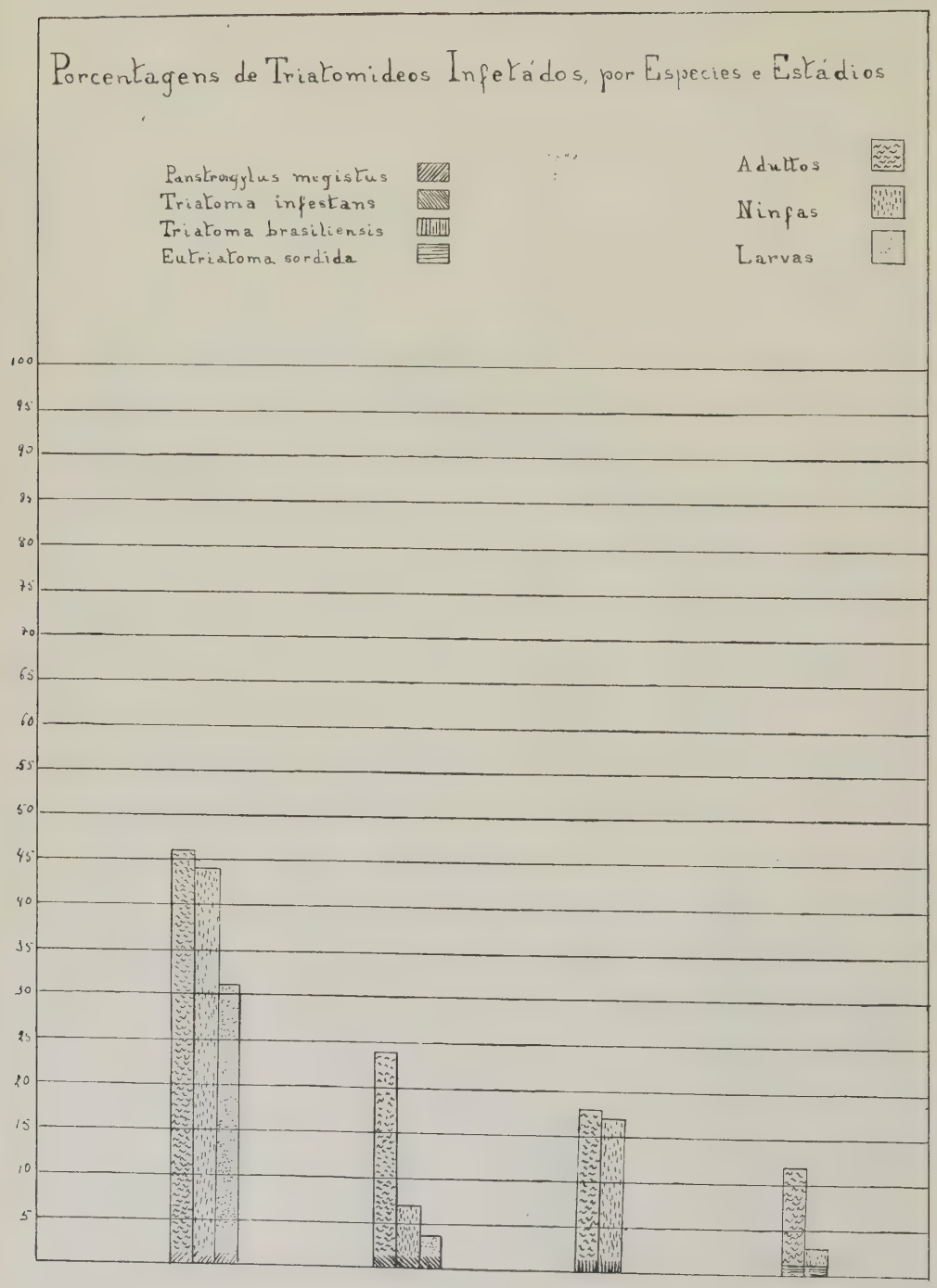

Porcentagens de Triatomideos Infetados, por Especies e Estádios
Panstrongylus megistus
Triatoma infestans
Triatoma brasiliensis
Eutriatoma sordida
Adultos
Ninfas
Larvas
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5

Gráfico 3

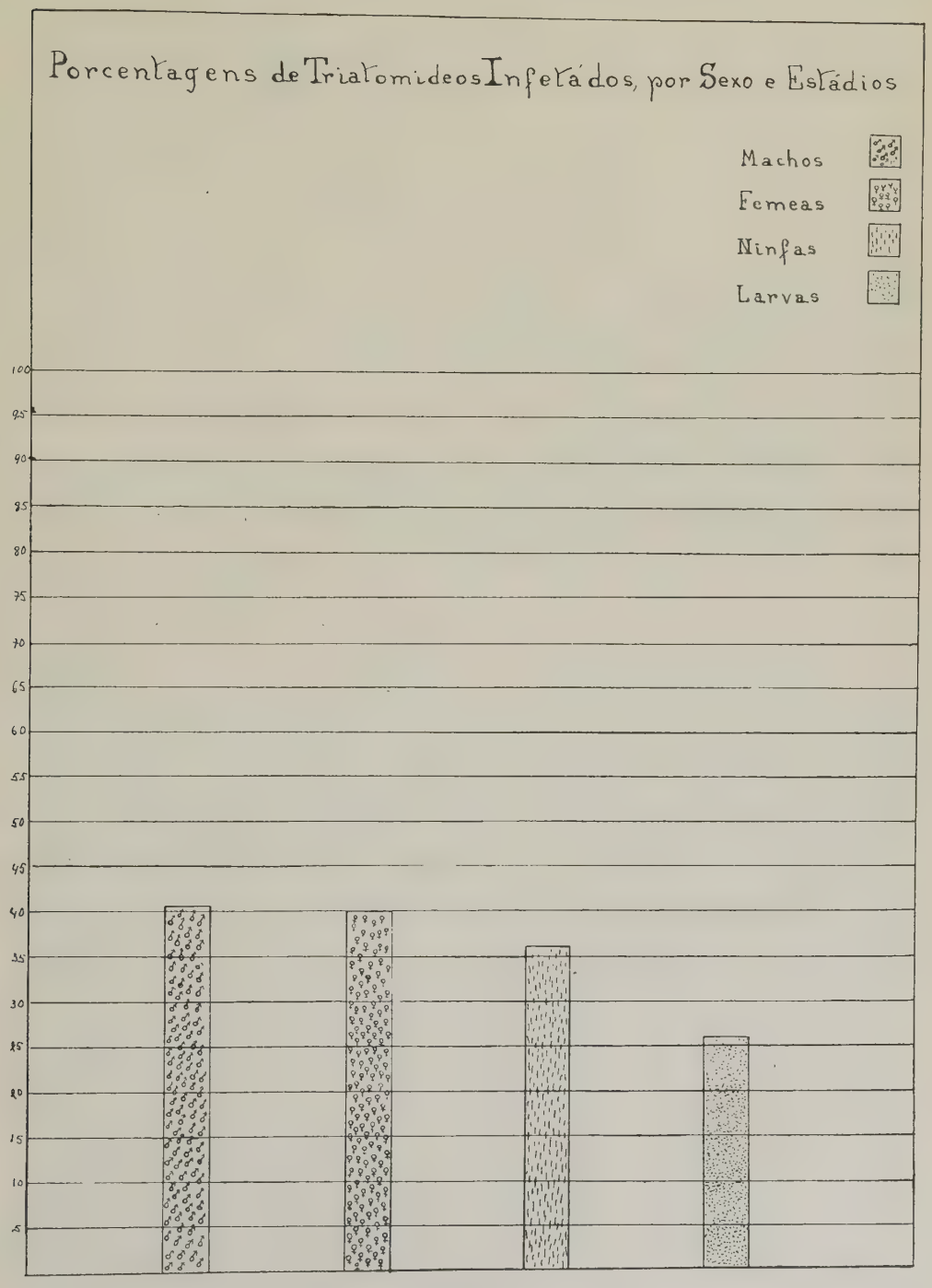

Porcentagens de Triatomideos Infetados, por Sexo e Estádios
Machos
Femeas
Ninfas
Larvas
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5

Gráfico 4

Os resultados acima estão mais ou menos de acôrdo com os obtidos por Dias infectando experimentalmente diversas espécies de triatomideos.

A percentagem global do *P. megistus* infectados aproxima-se da que foi encontrada em Lassance por Dias (1935) com a mesma espécie (36,7%). Si considerarmos, porém, as percentagens de infecção para os diferentes estádios verificamos que os nossos numeros diferem bastante dos de Dias, pois obtivemos para os adultos percentagem muito mais baixa (45,84%, Martins, Versiani e Tupinambá e 90%, Dias) e para as larvas, percentagem bastante mais alta (31,34%, Martins, Versiani e Tupinambá e 14,4%, Dias) enquanto que para as ninfas obtivemos quasi a mesma percentagem (43,68%, Martins, Versiani e Tupinambá e 48,9%, Dias).

Por varios motivos deixamos de examinar os especimens de *Psammolestes coreodes* capturados.

Pretendemos, contudo, examinar futuramente o maior numero possivel de exemplares dessa espécie, afim de procurar verificar a sua infecção natural, aliás muito pouco provavel.

DISTRIBUIÇÃO GEOGRAFICA DO *S. CRUZI*

Examinamos triatomideos provenientes de 118 municipios, tendo encontrado exemplares infectados pelo *Schizotrypanum cruzi* em 82 municipios. Nos 36 municipios restantes não foram encontrados « barbeiros » infectados, mas geralmente o numero de exemplares examinados provenientes desses municipios foi muito pequeno. Além desses recebemos de mais dois municipios (Alfenas e Perdões) exemplares de « barbeiros » que nos chegaram às mãos completamente sêcos, não tendo sido examinados.

Os municipios em que foram encontrados « barbeiros » infectados distribuem-se por todas as 9 zonas em que é arbitrariamente dividido o Estado de Minas, mostrando assim, como se póde vêr pelo mapa I, a existencia do *S. cruzi* em grande parte do territorio mineiro.

E' claro que com o prosseguimento dos nossos trabalhos a área de distribuição do *S. cruzi* deverá mostrar-se cada vez maior até possivelmente cobrir a quasi totalidade do Estado.

Quanto á percentagem de infecção dos « barbeiros » variou nos diferentes municipios de 1,8% (Bonfim[1]) a 100% (Eloi Mendes e Brasilia). E' preciso notar, porém, que de Brasilia só foi examinado 1 exemplar de *P. megistus* e de Eloi Mendes, 14 exemplares de T. infestans. Dos municipios de que foi examinado numero apreciavel de « barbeiros » e que maior indice mostraram foram Paroopeba (335 exemplares e 86,2%

positivos), São Domingos do Prata (159 e 71,0%) e Presidente Vargas (1.359 e 58,7%). Tambem o municipio de Jaboticatubas, onde estamos presentemente fazendo inquerito epidemiologico sobre a molestia de Chagas, apresenta percentagem bastante expressiva (45 exemplares e 82,2%).

ESTUDOS EPIDEMIOLOGICOS

Prosseguindo na execução do plano de estudo da Molestia de Chagas em Minas Gerais, iniciamos em Novembro de 1939 as pesquisas na 1.ª zona típica — Zona Central. Escolhemos para esse fim o municipio de Jaboticatubas, que apresenta a grande vantagem de estar muito proximo da capital à qual se acha ligado por ótima estrada de rodagem. Começamos os trabalhos na localidade denominada « Alagôas de D. Inácia », composta de cerca de uma duzia de habitações, na sua quasi totalidade cafúas de barro cobertas de sapé (apenas uma casa de tijolos coberta de telhas, sem reboco, porém). Dispõe-se esses cafúas em torno de uma lagôa que só se enche na época das chuvas, estando a localidade situada muito proximo (cerca de 1 quilometro) do Rio das Velhas. A região apresenta o aspéto típico do « sertão », com a sua flóra e fauna caracteristica. O tipo floristico predominante é o « cerrado », isto é, o campo com arvores de pequeno porte, de troncos retorcidos e geralmente com uma camada mais ou menos espessa de cortiça, como defesa contra as grandes sêcas. São muito comuns os pequizeiros (*Caryocas brasiliensis*), os muricis (*Byrsonima spp.*) e varias amonaceas. Os animais da região são principalmente tatús (*Dasypus novencinctus* e *Euphractus sexcinctus*), saguis (*Callithrix penicillata*), tapitis (*Silvilagus minensis*). Encontram-se mais raramente serelepes, e nas baixadas úmidas, preás. Nas matas mais fechadas ocorrem, segundo os moradores do local, lôbos, raposas, quatís e mesmo onças, porém todos esses animais parecem bastante raros. As gambás não são frequentes e morcegos de varias espécies são encontrados com certa facilidade.

Em todas as casas encontramos « barbeiros », que, embora não fossem muito abundantes, apresentavam-se infectados na percentagem de 82,2%. Esses « barbeiros » são principalmente *P. megistus,* encontrando-se raros *E. sordida.*

Todos os moradores de cada residencia são examinados metodicamente e o resultado desse exame que visa especialmente o aparelho circulatorio e o sistema nervoso, são registrados em fichas individuais (mod. I), os finais são reunidos e encapados por uma ficha residencial (mod. II), onde está consignado o tipo da residencia, o numero e o nome dos

moradores, a presença de insétos hematofagos, principalmente « barbeiros », o resultado do exame dos mamiferos domesticos (gota grossa e xenodiagnostico), um « croquis » da habitação, etc. Em cada pessôa é feito sistematicamente o exame do sangue em gôta grossa e o xenodiagnostico, usando, sempre que possivel, 5 « barbeiros » das espécies *P. megistus* ou *T. infestans*. Esses « barbeiros » criados no laboratório, são alimentados exclusivamente em pombos, afim de afastar qualquer possibilidade de contaminação. Concomitantemente é feita a pesquisa do *S. cruzi*, em todos os mamiferos silvestres capturados, usando-se para isso o exame a fresco entre lamina e laminula, a gôta grossa e o xenodiagnostico.

Já foram examinados até agora 32 animais silvestres e 77 pessôas residentes na região, nas « Alagôas » e em outras localidades muito proximas: Rancho Novo, Julião, etc. Os resultados desses exames e de outros a serem feitos serão publicados oportunamente.

E' interessante notar, porém, que os resultados dos exames a fresco e a gôta grossa dos animais silvestres até agora feitos (18 tatús-galinha — *Dasypus novencinctus*, 2 tatús-peba — *Euphractus sexcinctus*, 4 tapitis — *Silvilagus minensis* e 8 saguis — *Callithrix penicillata*) foram negativos para *S. cruzi*. Todos os saguis mostraram-se, contudo, parasitados pelo *Trypanosoma minanense* Chagas, 1908.

Os exemplares de *Dasypus novencinctus* apresentavam-se frequentemente infectados pela *Tunga travassosi* Pinto e Dreyfuss e todos os *E. sexcinctus* tinham no sangue microfilarias. Foram encontrados, tambem, microfilarias em alguns *D. novencinctus* e *C. penicillata*.

Anteriormente, em 1938, haviamos feito 6 xenodiagnosticos em moradores das « Alagôas » obtendo dois resultados positivos. Os exames clinicos feitos até agora mostram, tambem, uma percentagem anormalmente alta de perturbações do ritmo cardiaco.

Pretendemos, em vista disso, fazer electrocardiogramas do maior numero possivel de moradores da região, contando para isso com a colaboração do ilustre cardiologista Dr. Aristoteles Brasil. Esse trabalho dará, sem duvida, resultados bastante interessantes.

Uma vez terminado o inquerito epidemiologico nessa 1.ª zona, iniciaremos o estudo da 2.ª zona, já tendo escolhido o municipio de Presidente Vargas, as margens do rio Piracicaba, afluente do Rio Doce, de onde temos recebido grande numero de « barbeiros » infectados e onde, segundo nos consta com segurança, os casos de morte subita são extraordinariamente frequentes.

Resultados obtidos com as diferentes espécies

		Total	Positivos	Negativos	Percentagem de positivos
P. megistus	Adultos	2794	1281	1513	45,84 o/o
	Ninfas	1410	616	794	43,68 o/o
	Larvas	1643	515	1128	31,34 o/o
	Total	5847	2412	3435	41,25 o/o
E. sordida	Adultos	346	42	304	12,14 o/o
	Ninfas	172	5	167	2,90 o/o
	Larvas	194	0	194	0,00 o/o
	Total	712	47	665	6,60 o/o
T. infestans	Adultos	354	84	270	23,73 o/o
	Ninfas	140	10	130	7,14 o/o
	Larvas	187	8	179	4,27 o/o
	Total	681	102	579	14,98 o/o
T. brasiliensis	Adultos	17	3	14	17,65 o/o
	Ninfas	24	4	20	16,67 o/o
	Larvas	25	0	25	0,00 o/o
	Total	66	7	59	10,60 o/o
T. vitticeps	Total	2	2	0	—
E. maculata	Total	1	0	1	—
Rhodnius sp.	Total	9	0	9	—
P. geniculatus	Total	8	0	8	—

Total	geral	7.326	
Total	posit.	2.570	35,08 o/o
Total	negat.	4.756	
Machos	total	1.652	
Machos	posit.	663	40,13 o/o
Machos	negat.	989	
Femeas	total	1.873	
Femeas	posit.	749	39,99 o/o
Femeas	negat.	1.124	
Ninfas	total	1.752	
Ninfas	posit.	635	36,24 o/o
Ninfas	negat.	1.117	
Larvas	total	2.049	
Larvas	posit	523	25,52 o/o
Larvas	negat.	1.526	

Ação do oxigenio sob pressão sobre a ação patogenica dos germens anaerobios *

por

Genesio Pacheco e Gobert Araujo Costa

(Com 1 figura no texto)

Estudando a influencia do O^2 sob pressão sobre culturas de bacterias anaerobias ocorreu-nos verificar a possibilidade de sobrevirem modificações na patogenia desses germens.

Tecnica — Tomamos duas amostras de anaerobios, selecionadas dentre as que se revelaram regular e fortemente patogenicas para cobaias de cerca de 300 grs., ou para camondongos de 18-20 grs. de peso, determinando préviamente a *d. i. m.* (dose infectante minima mortal) para esses animais. Semeados os germens em caldo de Tarozzi, faziam-se repiques repetidos cada 6 horas de vegetação, para evitar esporulação das bacterias. Depois de algumas passagens sucessivas no meio de Tarozzi tomava-se uma cultura de 6 horas e distribuia-se em tubos estereis, na quantidade de 5 cc. para cada tubo. Os tubos eram colocados numa camara de pressão, ligada a uma botija de O^2. Introduzido o gaz na camara fechada, até 2 atmosferas de pressão, fechava-se a comunicação com a botija e esvasiava-se o aparelho, repetindo-se a manobra duas vezes seguidas para lavagem do ar existente na camara. Finalmente, introduziam-se nela 3 atmosferas de O^2, conservando definitivamente fechada a saída de descarga, acompanhando-se a constancia de pressão do gaz pelo manometro. Após contacto de algumas horas eram feitas provas de inoculação em cobaias ou camondongos. Durante o tempo de exposição ao O^2 uma cultura gemea era deixada á temperatura ambiente para contraprova.

Havia dissolução de O^2 na suspensão de bacterias pela permanencia na camara porque ao ser retirada observava-se desprendimento de bolhas de gaz da massa liquida para a superficie.

Camara de pressão — O aparelho que usamos foi um cilindro de de aço, de fundo cégo, com uma tampa adaptavel com parafusos para

* Recebido para publicação a 23 de Fevereiro de 1940 e dado á publicidade em Julho de 1940.

(Trabalho em cooperação com a Secção de Estudos das Infecções Anaerobias, anexa á Secção de Cancerologia da Fundação Gaffrée - Guinle, sob a direção do Professor Alvaro Ozorio de Almeida).

aumentar a justaposição e dois orificios, um para entrada e outro para descarga de gaz. A indicação da pressão era dada pelo manometro da botija de gaz, comunicando permanentemente com o interior do aparelho.

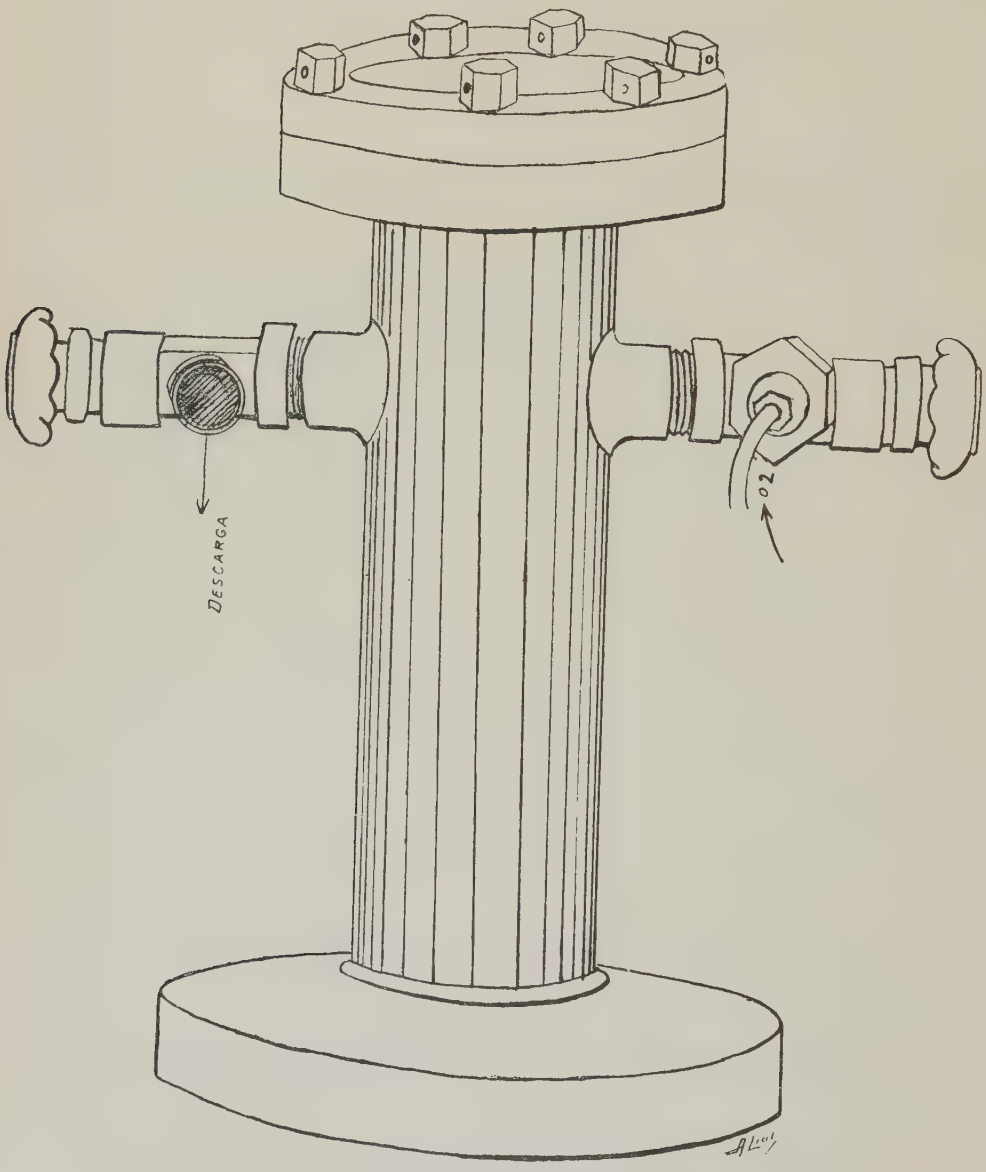


Fig. 1

O aparelho, visto no desenho, foi calculado para suportar até 150 atmosferas e suas paredes foram impermeabilisadas com banhos de estanho, tendo-se encarregado da sua construção o Dr. Henrique Peixoto de Oliveira, engenheiro do serviço de Cancerologia do Prof. Alvaro Ozorio de Almeida na Fundação Gaffrée-Guinle. Este aparelho foi-nos graciosamente oferecido pelo Dr. Guilherme Guinle que autorisou sua fabricação no serviço do Prof. Alvaro Ozorio de Almeida, aos quais agradecemos de publico a cooperação.

EXPERIENCIAS COM CLOSTRIDIUM NOVYI

Exp. I — *Clostridium Novyi* (Cl. 153). *D. i. m.* para cobaia 0,005 cc. por via muscular. Após 24 hs. de permanencia em 2 atmosferas de O^2, a cultura foi injectada em 2 cobaias, uma com 0,05 cc. e outra com 0,1 cc. A primeira morre no 8.º dia e a outra, que recebeu maior dose, morre no 3.º dia, ambas com gangrena.

Exp. II — Mesmo germen da exp. I. Após 4 horas de 2 atmosferas de O^2 e mais 4 horas com 3 atmosferas, são inoculadas duas cobaias nas doses de 0,01 e 0,005 cc. de cultura. A primeira morre no 3.º dia e a outra, inoculada com menor dose, morre após 10 dias, ambas com gangrena.

Exp. I e II

Clostridium Novyi (Cl. 153)

D. i. m. para cobaia via intra-muscular — 0,005 cc.

Cobaia No.	Tempo de exposição da cultura em 0^2	Pressão em atmosferas	Dose injetada	RESULTADO
1	24 horas	2	0,05 cc.	+ c/8 dias
2	«	«	0,1 cc.	+ c/3 dias
3	4 horas mais 4 horas	2 3	0,1 cc.	+ c/3 dias
4	«	«	0,005 cc.	+ c/10 dias

Exp. III — Cultura da mesma bacteria acima, submetida a 2 atmosferas de O^2 durante 5 horas, é injectada em 6 cobaias: 2 com 0,01 cc., 2 com 0,04 cc., e 2 com 0,1 cc. Morrem somente as duas ultimas, uma após 3 dias e outra no 4.º dia, ambas de gangrena. As demais, apresentam apenas ligeiro edema no musculo injectado.

Exp. III

Clostridium Novyi (Cl. 153)

D. i. m. para cobaia via intra-muscular — 0,005 cc.

Cobaia No.	Tempo de exposição da cultura em 0^2	Pressão em atmosferas	Dóse injetada	RESULTADO
1	5 horas	3	0,01 cc.	sobrevive
2	«	«	«	«
3	«	«	0,04 cc.	«
4	«	«	«	«
5	«	«	0,1 cc.	+ com 3 dias
6	«	«	«	+ com 4 dias

EXPERIENCIAS COM CLOSTRIDIUM WELCHII

O *Cl. Welchii*, sendo mais regularmente patogenico para camondongos, foi preferido este animal para as provas experimentais.

Clostridium Welchii (Cl. 5) — A *d. i. m.* para camondongo foi determinada pelas vias muscular e peritoneal, achando-se 0,2 e 0,1 cc. de cultura, respectivamente. Mas, enquanto a via muscular se nos mostrou irregular na dose infectante mortal, a via peritoneal matou sempre com regularidade, dentro de 24 horas da inoculação de uma cultura de 24 horas em caldo de Tarozzi.

Exp. IV — Cultura de 24 horas foi submetida a 3 atmosferas de O^2 durante 8 horas. Inoculada, depois desse tratamento, em 8 camondongos, de 18-20 grs. de peso: 2 com 1 cc.; 2 com 0,5; 3 com 0,25 cc.; 1 com 0,1 cc. Apenas morrem os 2 primeiros, inoculados com 1 cc., dentro de 24 horas da inoculação. Os demais nada aparentam.

Exp. IV

Clostridium Walchii (Cl. 5)

D. i. m. para camondongos via intra-peritoneal — 0,1 cc.

Camondongos No.	Tempo de exposição da cultura em 0^2	Pressão em atmosferas	Dóse injetada	RESULTADO
1	8 horas	3	1 cc.	+ no mesmo dia
2	«	«	«	«
3	«	«	0,5 cc.	sobrevive
4	«	«	«	«
5	«	«	0,25 cc.	«
6	«	«	«	«
7	«	«	«	«
8	«	«	0,1 cc.	«

Exp. V — Mesmo germen e condições identicas da exp. IV. Ação do O^2 prolongada por 72 horas. Depois desse tratamento são inoculados, com a cultura assim tratada, 9 camondongos: 3 com 0,5 cc.; 3 com 0,25 cc.; 3 com 0,1 cc. Morreram os inoculados com 0,5 cc. e com 0,25 cc., no mesmo dia da inoculação; sobreviveram os inoculados com 0,1 cc.

Exp. V

Clostridium Welchii (Cl. 5)

D. i. m. para camondongos via intra-peritoneal — 0,1 cc.

Camondongos No.	Tempo de exposição da cultura em 0^2	Pressão em atmosferas	Dóse injetada	RESULTADO
1	72 horas	3	0,5 cc.	+ no mesmo dia
2	«	«	«	«
3	«	«	«	«
4	«	«	0,25 cc.	«
5	«	«	«	»
6	«	«	«	«
7	«	«	0,1 cc.	sobrevive
8	«	«	«	«
9	«	«	«	«

Exp. VI — Nesta experiencia, feita com o mesmo germen, prolongamos o tempo de exposição ao O^2 por 6 dias. Depois desse tratamento inocularam-se 9 camondongos: 3 com 1 cc.; 3 com 0,5 cc.; 3 com 0,25 cc. Morreram todos os que receberam 1 e 0,5 cc. e 2 dos 3 inoculados 0,25 cc. Os demais sobreviveram.

Exp. VI

Clostridium Welchii (Cl. 5)

D. i. m. para camondongo via intra-peritoneal — 0,1 cc.

Camondongos No.	Tempo de exposição da cultura em 0^2	Pressão em atmosferas	Dóse injetada	RESULTADO
1	6 dias	3	1 cc.	+ no mosmo dia
2	«	«	«	«
3	«	«	«	«
4	«	«	0,5 cc.	«
5	»	«	«	«
6	«	«	«	«
7	«	«	0,25 cc.	«
8	«	«	«	sobrevive
9	«	«	«	«

DISCUSSÃO

A literatura da ação do O^2 sobre bacterias será examinada em outro trabalho. Por ora interessa saber o que existe registrado quanto á influencia desse gaz sobre a patogenia das bacterias.

Nossas experiencias revelam uma reducção da patogenia, mais acentuada com o prolongamento da ação do oxigenio. Nas 2 primeiras experiencias, com o *Cl. Novyi,* não houve redução da infecciosidade do germen durante 4 horas de permanencia em 2-3 atmosferas de O^2; apenas a evolução do processo gangrenoso foi prolongada numa das cobaias, a que recebeu dose menor. Na experiencia 3 houve redução evidente do poder infectante, pois só se infectaram e morreram as cobaias que receberam 0,1 cc., isto é, dose 10 vezes maior que a dose infectante minima mortal da cultura não tratada pelo O^2.

As experiencias com *Cl. Welchii* evidenciaram egualmente uma redução da patogenia da bacteria pela ação do O^2. Na primeira experiencia com este germen (exp. 4), a *d. i. m.* foi 10 vezes maior que a normal. Na experiencia seguinte, em que se prolongou a permanencia de cultura no O^2 por 72 horas, reduziu-se a 2,5 a *d. i. m.* Extendendo a permanencia do germen no oxigenio até 6 dias o resultado não foi desta vez alterado.

Rosenthal, trabalhando com *B. gracillis ethylicus,* Achalme & Ros. e com bacilo thylogenico (?) (bacille grácille et bacille thylogenique), anaerobios do intestino adaptados a crescer em tubos com caldo aerobio, sem camada de lanolina, perderam com esta circunstancia sua virulencia.

Sendo conhecida a existencia de uma ação do oxigenio sobre bacterias, previstas por Paul Bert e tambem determinada por Foá, embora só aparente com 4 atmosferas, tornou-se necessario verificar si a redução da patogenia ora observada não decorria de morte parcial das bacterias submetidas á ação do oxigenio. Realmente foi o sucedido, pois encontramos até mais de 90% de morte dos germens assim tratados. E' necessario assinalar que a redução da patogenia deveria ser maior em consequencia de tão consideravel redução do numero de baterias viaveis mas os germens sobreviventes haviam esporulado em consequencia da ação do O^2, como referiremos em outro trabalho, e esta condição é muitas vezes favoravel á infecciosidade das bacterias.

Beveridge observara com culturas de *B. necrophorus* (bacilo de Schmorl, *Actinomyces necrophurus* Lehm. & Neum.), expostas ao ar em camada delgada sobre placas de Petri, a morte de todas as bacterias experimentadas nestas condições, dentro de 48 horas. Tambem Fry & Dack verificam ação lethal do oxigenio sobre esta bacteria quando o gaz era

borbulhado nas culturas, ou introduzido em segmento de alça intestinal isolada, *in-vivo*.

No nosso caso a esporulação pode ter tido algum papel na infecciosidade e permite pensar que sua existencia deve ter influido na conservação da virulencia.

RESUMO

1) O^2 sob pressão reduz a patogenia de bacterias anaerobias.

2) Esta ação do O^2 aumenta com o prolongamento da exposição das suspensões bacterianas ao gaz.

3) A redução decorre da morte da maioria das bacterias submetidas á ação do O^2.

SUMMARY

1) O^2 under pressure reduces the infectiosity of anaerobic bacteria.

2) This action of O^2 is increased with the lengthening of the time of exposure of the bacterial suspensions to the gas.

3) The reduction in infectivity is due to the death of the greater part of the bacteria submitted to the action of the O^2.

LITERATURA REFERIDA

Beveridge, W. I. B.

1934. Journ. Path. & Bact., **38** : 467.

Foa, Carlo

1906. Atti della Accademia dei Lincei, **15** : 53.

Fry, F. O. & Dack

1936. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **35** : 456.

Paul Bert

1875. Compt. Rend. Acad. Séances, **80** : 1579.

Rosenthal, G.

1906. Compt. Rend. Soc. Biol., **60** : 1116.

Produção de H^2S pelos Clostridios anaerobios *

por

Genesio Pacheco e Gobert Araujo Costa

Ainda é imperfeito o conhecimento da capacidade sulfurigena dos clostridios anaerobios. Apesar de Spray achar provavel que todos eles sejam produtores de H^2S, na especificação final das especies estudadas no seu trabalho de revisão refere o *Clostridium histolyticum*, *Cl. multifermentans*, *Cl. butyricum*, *Cl. septicum*, *Cl. botulinum* tipo C. e o *Cl. tetanomorphum* entre os não produtores de hidrogenio sulfurado. Nos trabalhos de Zeissler e de Weinberg não é referida individualmente a capacidade sulfurigena dessas bacterias e em outros trabalhos é ella inteiramente desprezada na especificação (Bergey *ed al*). Por outro lado não ha uniformidade quanto a esta propriedade dos anaerobios. Topley & Wilson incluem o *Cl. tetani* como não sulfurigeno enquanto que Spray o inclue no grupo dos produtores de H^2S.

Naturalmente tem contribuido para imperfeição do conhecimento dessa propriedade dos clostridios anaerobios a fraca sensibilidade dos indicadores da presença de H^2S até então usados na sua pesquisa.

Tendo proposto o bismuto como indicador da presença desse gaz e tendo verificado suas vantagens sobre os outros meios de emprego corrente até agora, tentamos experimental-o na pesquisa da produção de H^2S pelos clostridios anaerobios.

Verificamos, desde logo, que embora revelando produção de hidrogenio sulfurado com a quasi totalidade das amostras de anaerobios submetidos a provas, o escurecimento era por vezes muito discreto para permitir assegurar franca produção de gaz sulfidrico por parte da bacteria. Aliás já observaramos o mesmo em trabalho anterior com duas especies de brucelas, uma amostra de *melitensis* e outra de *paramelitensis*, numa série de bacterias experimentadas.

Convencemo-nos, por isso, da necessidade de melhorar a sensibilidade do meio anteriormente proposto para pesquisa da capacidade sulfurigena em relação aos anaerobios.

As vantagens conhecidas do emprego do figado ou produtos deri-

* Recebido para publicação a 23 de Fevereiro de 1940 e dado á publicidade em Julho de 1940.

vados dele no crescimento de bacterias anaerobias foram assinaladas desde Tarozzi, e a ação favoravel da cistina na produção de H^2S foi evidenciada por Tylley.

A associação das duas substancias deveria, por conseguinte, aumentar a produção de H^2S desprendido pelos clostridios na clivagem da cistina, substancia rica de enxofre, decorrente do aumento da vegetação bacteriana.

Partindo desta hipótese preparamos um meio basico contendo:

Peptona Witte	1,5
Cloreto de sodio	0,25
Agar	0,15
Cistina	0,005
Agua a completar	50 cc.

A este meio juntamos quantidades variaveis de extrato de figado-baço: papa de figado e baço, desembaraçados das capsulas e aponevroses, misturada a volume duplo de agua. Aquecer a b. m. fervente durante 1 hora para destruir as propriedades antitripticas. Esfriar. Alcalinisar pela adição de NaOH n/10. Juntar extrato pancreatico, segundo Cole & Onslow, e mais cloroformio. Deixar a 37°, agitando 2-3 vezes até prova de triptofana positiva. Aquecer á fervura, neutralisar, filtrar, distribuir, esterilisar a 115°.

Depois de preparado o meio adicionar carbonato de bismuto a 0,5%. Distribuir em tubos, camada alta. Esterilisar. Agitar os tubos ao sair do autoclave, no momento de resfriamento e gelificação, para distribuição uniforme do indicador na massa do meio.

Numa série de partidas desse meio adicionamos 25, 10, 5, 2,5, 1,25 e 0,5 cc., respectivamente, de extrato de figado-baço, designando-os I, II... VI. Dois outros meios serviram de contraprovas, um sem extrato de figado-baço, correspondendo ao meio primitivo utilisado em trabalho anterior (VII), e outro identico a este, mas desprovido de peptona (VIII). A quantidade de agar foi reduzida a 0,3% para dar ao meio uma consistencia mais mole para favorecer a produção de H^2S (Vaughan & Levine).

Os resultados da influencia do extrato de figado-baço em comparação com as contraprovas podem ser vistos no quadro I, em que foram os diferentes meios semeados com *Clostridium Welchii*, amostra 21, bôa produtora de H^2S.

Quadro I

	2 hs. 30	3 hs.	3 hs. 30	4 hs.	4 hs. 30	6 hs.	7 hs.	24 hs.
Meio I	±	+	+	+	+	+	++	+++
Meio II	±	±	±	±	±	+	+	+++
Meio III	±	+	+	+	+	++	++	++++
Meio IV	∓	±	±	±	+	+	++	++++
Meio V	—	±	+	+	+	++	−+	++++
Meio VI	∓	±	±	±	±	+	+	++++
Meio VII	—	∓	∓	∓	±	±	+	++++
Meio VIII	∓	∓	±	±	±	+	+	++++

Notações: — negativo, ∓ traços, ± fraca produção, + a ++++ graus de produção.

Nas leituras procedidas no correr das 24 horas de incubação observamos que com 10% de concentração de extrato de figado-baço houvera notavel produção de H^2S dentro de 6 horas de vegetação e que já com 3 horas o escurecimento era francamente visivel. O meio facultava a leitura, portanto, dentro do mesmo dia da prova. Com concentrações menores a quantidade final de H^2S foi sempre a mesma mas sua produção se tornava consideravelmente mais lenta.

E' oportuno assinalar que a nós interessava obter um meio de produção rapida de H^2S, possuindo um indicador egualmente rapido.

Fixada a proporção ótima de extrato restava comparal-o com o meio primitivo proposto por nós. E' o que se vê no quadro II, onde se verifica que a modificação foi vantajosa, não só tendo sido apressada a produção de H^2S, dando reações precoces com o bismuto, como tambem indicando a presença deste gaz em amostras de anaerobios até agora admitidas não sulfurigenas como o *Cl. histolyticum*. Experimentando varias amostras para verificar a sensibilidade do meio, em comparação, encontramos maior sensibilidade do meio com extrato figado-baço. Com o *Cl. Novyi* 152, que não revelou o meio primitivo a produção de H^2S foi este patenteado plenamente no meio com extrato de figado-baço. Com o *Cl. septicum* em que a produção no primeiro foi fraca, e só observada com 24 horas, era evidente em 6 horas com o meio com extrato de figado-baço.

Outro detalhe examinado no preparo do meio foi em relação á junção da cistina. Experimentamos adicional-a á parte, em solução esterilisada a frio, por filtração em vela esterilisante, para evitar ligeiro escurecimento aparecido no meio durante a esterilisação, quando a cistina era adicionada antes dessa operação. A cistina só se dissolve e se mantem dissolvida em presença de acido e essa particularidade dificulta sua junção ao meio depois de esterilisado, com pH já acertado, obrigando á inconveniente abertura posterior do continente para reajustamento da reação. A acidificação foi tão consideravel com a junção posterior da cistina que o meio deixou de dar indicação da formação de gaz por ter-se tornado improprio á vegetação bacteriana. Tambem tentamos dissolver a cistina em meio acido e depois de neutralisal-a juntar ao meio, mas os resultados foram menos bons. A vista disto permanecemos como anteriormente, juntando a cistina, ajustando o pH e em seguida esterilisando.

Fixadas as bases da preparação de meio restava aplical-o a um grande numero de amostras de clostridios e o fizemos em comparação com o meio proposto por Spray, para julgar de sua eficiencia e ao mesmo tempo investigar a capacidade sulfurigena dos clostridios anaerobios. Os resultados são vistos no quadro III.

Quadro II

		1 h. 30	2 hs.	2 hs. 30	3 hs.	3 hs. 30	4 hs.	4 hs. 30	6 hs.	7 hs.	24 hs.	48 hs.
Cl. Welchii (Cl. 21)	Meio I	–	–	±	±	±	+	+	++	++	+++	++++
	Meio II	±	+	+	++	++	++	++	+++	+++	+++	++++
Cl. histoliticum (Cl. 107)	Meio I	–	–	–	–	–	–	–	±	±	+++	++++
	Meio II	–	–	–	±	±	+	+	+	+	+++	++++
Cl. Novyi (Cl. 152)	Meio I	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Meio II	–	–	±	±	±	+	+	+	+	+++	++++
Cl. tetani (Cl. 244)	Meio I	–	–	–	±	±	±	±	+	+	++	++++
	Meio II	–	–	±	±	±	±	±	+	+	+++	++++
Cl. septicum (Cl. 70)	Meio I	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
	Meio II	–	–	–	–	–	–	–	±	±	+	++

I — Meio primitivo de Pacheco & Mello.
II — Meio modificado, com extracto figado-baço.

Verifica-se pelo quadro que o meio com bismuto se mostrou consideravelmente superior ao meio proposto por Spray para revelar a presença de H^2S nas culturas de anaerobios.

As reações observadas no meio com bismuto foram extremamente nitidas, destacando-se desde inicio pela tonalidade castanha, que se acentua até negro nas reações fortes, dentro de 24 horas de cultura.

Outro tanto não sucede com o meio Spray, no qual raramente se percebe a reação no mesmo dia da semeadura, e após 72 horas de incubação ainda se fica ás vezes em duvida para decidir da positividade, indicativa da presença de H^2S. Sempre se deve fazer a leitura da prova de Spray contra o fundo branco, nunca por transparencia.

Outra vantagem do meio com bismuto na fórmula ora proposta é a precocidade da reação. Nas especies fortemente sulfurigenas, como o *Cl. Welchii*, é ela francamente visivel com 2 horas de cultura a 37°. E esta vantagem não é para se despresar, si por acaso a prova tiver importancia na especificação rapida de uma dada amostra.

Revelou-se perfeitamente sensivel o meio de bismuto na demonstração da capacidade sulfurigena de todos clostridios anaerobios experimentados. Encontraram-se amostras de uma ou de outra especie, lenta ou fracamente sulfurigena, mas o gaz se formou sempre em todas as amostras ao cabo de 24 horas de cultura a 37°.

Foram produtores mais precoces o *Cl. Welchii*, *Cl. tetani*, *Cl. tertius*, *Cl. bifermentans*, *Cl. sordelli*, *Cl. sphenoides* e o *Cl. fallax*.

RESUMO

a) A junção de extrato de figado-baço ao meio com bismuto se mostrou muito favoravel no aumento da produção de H^2S pelos clostridios anaerobios.

b) O bismuto ajuntado ao meio com extrato figado-baço revelou maior sensibilidade ao H^2S que o meio com ferro de Spray.

c) O emprego do meio extrato de figado-baço-cistina, com indicador de carbonato de bismuto, revelou a produção abundante de H^2S por todos os anaerobios submetidos á prova de produção de H^2S, o que não aconteceu com o emprego de ferro como indicador de reação.

d) Certas especies de clostridios possuem capacidade sulfurigena mais precoce e intensa que outras.

e) Ha variações individuais na precocidade da capacidade sulfurigena dos anaerobios.

SUMMARY

a) The addiction of liver-spleen extract to the medium with bismuth seems to have favored greatly the increase of the production of H^2S by anaerobic clostridia.
b) Bismuth added to the medium with liver-spleen extract showed greater sensibility to H^2S than Spray's medium with iron.
c) The employment of the liver-spleen-cystine medium, with bismuth carbonate as indicator, revealed an markedely production of the H^2S by all the anaerobi submitted to the H^2S production test, which was not the case when iron was used as indicator of the test.
d) Some species of clostridia have an earlier and more intense sulphidrigenous capacity than others.
e) There are individual variations among anaerobes in their capacity for early production of hydrogen sulphide.

LITERATURA

Bergey ed al
1939. Manual of Determinative Bacteriology.

Cole & Onslow apud Hildred M. Butler
1937. Blood Cultures and their significance. London.

Pacheco, G. & Mello, J. T.
1932. Compt. rend. Soc. Biol., **110** : 131.

Pacheco, G., Noronha Peres, J. & Viviani Mattoso, I.
1939. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, **34** : 527.

Spray, R. S.
1936. Journ. Bacter., **32** : 135.

Tarozzi, G.
1905. Centralbl. für Bakt. und Infek., **38** : 619.

Tylley, F. W.
1923. Journ. Bact., **8** : 287.

Topley & Wilson
Principles of Bacteriology and Immunity — Second Edition.

Vaughan & Levine
1936. Journ. Bact., **31** : 24.

Weinberg, M., Nativelle, R. & Prevot, A. B.
1937. Les microbes anaerobies.

Zeissler, J.
1930. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen — (Kolle und Wassermann), 3.ª Ed.: **10**.

Estudos sobre os elementos figurados do sangue do crustaceo Uca pugnax (Smith) var. brasiliensis Oliveira

(Decapoda: Ocypodidae)

por

Lejeune P. H. de Oliveira e Cicero A. Moreira

(Com 1 estampa)

Estudamos os elementos morfologicos do sangue ou hemolinfa de *Uca pugnax* variedade *brasiliensis* (10) em parte por não existir na bibliografia dos globulos sanguineos dos crustaceos referencia a sangue no genero *Uca* e em parte por termos á mão abundante material. Tomamos como base para este trabalho os estudos já feitos sobre sangue de outros crustaceos, seguindo preferivelmente os indicados nas referencias bibliograficas.

COLHEITA DO SANGUE E MÉTODOS DE ESTUDO

Uma das maneiras mais simples de se obter pequenas quantidades de sangue de um caranguejo consiste no córte de um ou mais articulos de uma de suas patas, onde vem a brotar uma grande gota de sangue. Depois disto resta-nos apenas, para observarmos os seus elementos morfologicos, fazer um exame microscopico entre lamina e laminula, e tambem em gota pendente. Este método tão rudimentar oferece varias vantagens, mas em compensação tropeça com sérios embaraços. Por exemplo, quando nos achamos em presença de um protozoario ou de qualquer outra forma viva, sentimos grande duvida sobre sua proveniencia, pois eles poderiam ter vindo tanto do proprio sangue, quanto serem procedentes do material que recobre o crustaceo formando um inducto esverdeado. Além destes defeitos, esta tecnica tem o inconveniente de atingir outros tecidos, de cujas malhas recolhe uma série de células, acarretando elementos inteiramente estranhos para o sangue em exame. Tambem possue a desvantagem de

* Recebido para publicação a 7 de Março de 1940 e dado á publicidade em Agosto de 1940.

lesar o animal pelo corte vasto em suas patas e exgota-lo com a subsequente hemorragia.

Para impedir a reunião de outras células ao sangue, usou-se em larga escala a amputação de antenas, um processo ótimo indicado atualmente para varios camarões, lagostas e outros macrura, mas infelizmente impraticavel nos nossos carangueijos que possuem estes apendices muito curtos.

Com a mesma finalidade de evitar elementos extranhos ao sangue do crustaceo, Hardy puncionava, na lagosta, diretamente o seio pericardico, por meio de uma pipeta capilar.

Observamos que podemos penetrar com a pipeta capilar, de vidro, nas patas, através da membrana articular e recolhermos diretamente o sangue de dentro do articulo, em numerosos decapodos brachiura, como a *Uca pugnax* (Smith, 1870), var. *brasiliensis* Oliveira, 1939; *Panopeus herbsti* Milne Edwards, 1834; *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1767); *Cardisoma guanhumi* (Latreille, 1825) e outros. Assim para a pinça de *Uca pugnax* var. *brasiliensis*, penetrariamos na cavidade quelipodo carpal, seguindo uma direção obliqua com a pipeta, passariamos entre os feixes dos musculos levantadores e abaixadores do datilo sem os lesar, e apanhariamos o sangue dentro do dedo imovel, sem contaminação por outras células nem por material externo. Com poucas tentativas feitas aprende-se a achar esta direção obliqua aonde a pipeta capilar não encontra resistencia alguma ao descer. Limpa-se bem com um algodão humedecido em alcool a membrana articular, e enfia-se a pipeta; quando ela chega ao local conveniente o sangue sóbe expontaneamente por capilaridade, claro, transparente, tornando-se, pelo contacto com o ar, ligeiramente azulado. Em seguida gelatinisa-se pouco tempo depois, sem formação de sôro e sem retração de coagulo e passados vinte minutos entra na segunda fase de coagulação, com formação de sôro. Não é recomendavel aspirar a pipeta, o que forçosamente trará fragmentos de tecidos musculares, cuticulares e outras tantas células extranhas se a pipeta se achar em má posição. Na pinça maior ou em qualquer outro articulo do crustaceo podemos chegar a retirar mesmo dois ou mais centimetros cubicos de sangue por aspiração com uma seringa, mas em geral o animal morre logo após tal sangria ou abandona a pinça autotilisando-a antes de chegarmos mesmo a um centimetro cubico.

Usando a pipeta capilar e recolhendo o sangue do modo descrito, atribuimos haver: facilidade e rapidez de manipulação; ausencia de contaminação com elementos extranhos, provenientes de outros tecidos ou do exterior; minimo de mutilação e consequente economia de material.

Outro processo que tambem usamos com bom resultado foi o de Knover (6), modificado pelo professor Dr. Paulo Sawaya(11): consiste em se trabalhar com uma pipeta tendo uma parte globosa onde o aquecimento da mão e o posterior esfriamento pelo ambiente faz a pipeta se encher e se esvasiar. Aqui no Rio de Janeiro em dias frios este processo dá ótimos resultados, mas no verão ele se torna muito moroso.

E' conveniente notar que os glóbulos do sangue de *Uca pugnax* riedade *brasiliensis* como o de numerosos invertebrados são de constituição muito instavel. Assim logo que saem dos vasos eles se deformam e muitas vezes quando colocados entre lamina e laminula, as células se lisam, restando ao examinarmos o material apenas massas de protoplasma provenientes da sua destruição. Sendo objeto primordial de um estudo perfeito a preservação da forma natural, a fixação deve ser imediata e feita a humido, usando nós de preferencia o sublimado alcoolico de Schaudinn. Não podemos obter esfregaços como os de sangue humano com *Uca pugnax brasiliensis*, em primeiro lugar pela grande viscosidade de seu plasma impossibilitar a distenção do sangue e em segundo lugar por apresentar num grande volume de plasma pequena quantidade de elementos figurados.

Entre os fixadores empregados pelos autores que têm trabalhado neste assunto destaca-se o acido osmico. Varios autores proscrevem sem explicação do motivo por que assim procedem, o alcool metilico, os fixadores a base de acido picrico e o formol. Este ultimo tem sido usado sobre a forma de vapores, em larga escala, assim como o iodo. Para nosso material os fixadores que deram os melhores resultados foram feitos usando o sublimado corrosivo, o sublimado acetico a 5% e o sublimado alcoolico de Schaudinn. Os fixadores á base de alcool só foram empregados para o estudo da influencia dos azues basicos sobre o citoplasma: verificação de varias granulações cromatofilas.

As principais colorações empregadas por nós foram: a hematoxilina ferrica de Heidenhein, segundo a tecnica indicada para protozoarios; o Giemsa, aplicado aos frotis humidos, segundo a tecnica recomendada por M. Langeron (12); frotis feito a sêco, tendo como fixador alcool metilico, e coloridos pelo Giemsa, para observar as granulações cromatofilas. Usamos tambem como fez Tait e Gunn (7) com os glóbulos do sangue do camarão europeu *Astacus fluviatilis* (Fabricius), um exame pelo iodo. Empregamos para isso solução de lugol usual em bacteriologia. Esse exame complementar pode ser feito de acordo com a seguinte tecnica: Coloca-se uma gôta de sangue sobre a lamina, mistura-se com uma de lugol, recobre-se com laminula; ou então coloca-se o lugol na margem da laminula, com uma pipeta, e deixa-se que penetre pouco a pouco por difusão.

ELEMENTOS MORFOLOGICOS DO SANGUE DE *UCA PUGNAX* VAR. *BRASILIENSIS*

Quando se examina entre lamina e laminula uma gota de sangue (ou hemolinfa tirado da pinça maior de *Uca pugnax brasiliensis* verifica-se em primeiro lugar dois tipos diferentes de células: 1.º) Umas células grandes, medindo em média 10 micra de diametro, muito brilhantes, de grande refringencia, de côr amarelada, de contornos muito definidos, com varios grãos enormes de cerca de 2 micra cada um. Estes são os *histiocitos granùlares.* 2.º) Outras células claras — os *tigmocitos* — palidas, que quasi não aparecem devido á sua pouca refringencia. Logo que uns dois ou tres minutos se passaram observamos que os tigmocitos se apresentam de dois modos: Com o tempo uns vão ficando com aspecto estrelado, apresentando vacuolos em seu interior e possuem umas granulações finissimas como uma poeira brilhante muito leve; outros não se alteram tanto; parece-nos que se esvasiam pela transparencia que vai tomando o protoplasma, e possuem ao redor de si o ectoplasma com contorno semelhante a um anel. Estes dois tipos de células constituem os principais elementos morfologicos encontrados no sangue de *Uca pugnax brasiliensis,* em estado normal: *Tigmocitos* e *Histiocitos granulares.*

TIGMOCITOS (de *Uca pugnax brasiliensis*)

(Figs. 4, 5, 6, 7, 10)

Os tigmocitos de *Uca pugnax brasiliensis* correspondem aproximadamente, em sangue de outros crustaceos, aos seguintes elementos: —

— «Globules sanguins» de Bruntz, 1906.

— «Hyaline thygmocits» e

— «Thygmocits» de Tait & Gunn, 1918.

— «Fine granular elements» de Hertzmann.

— «Explosive body» de Tait & Gunn, 1918.

— «Explosive corpuscle» (?) de Hardy, 1892.

Estes elementos logo que são removidos do corpo do crustaceo se apresentam como células de 8 a 13 micra de diametro, em média, menores que os histiocitos granulares. São células claras, ovoides ou arredondadas e não possuem os contornos muito nitidos. O tigmocito vae deixando aparecer um ou mais vacuolos, seu contorno vae se tornando pouco a pouco estrelado, são muito caracteristicos por isto.

A aparencia estrelada com que fica o tigmocito de *Uca pugnax brasiliensis* com 11 ou mais prolongamentos finos irradiando de seu corpo já aparece em tres ou quatro minutos depois que o sangue saiu do corpo do crustaceo.

Outros tigmocitos ficam com a forma esferica (fig. 6), mas quasi sempre apresentam no ectoplasma um pequenino começo de emissão de prolongamentos, havendo formas intermediarias entre o esferico e a forma estrelada.

Estes tigmocitos quando ficam com a forma esferica, são elementos muito

particulares do sangue de *Uca pugnax brasiliensis*. Medem em média 6 a 7 micra de diametro. O interior de seu protoplasma é claro e possue menos granulações que quando toma a forma estrelada. O que mais o caracterisa é a forma em anel circular, delgado e muito brilhante com que fica o ectoplasma. Neste anel se encontram pontuações de maior refringencia que mais o realçam, e donde ás vezes parte um pequeno começo de emissão de prolongamentos.

Os elementos mais jovens (figs. 8 e 9) são em pequeno numero, são de pequeno talhe (4 a 5 micra), de citoplasma mais denso, finissimamente granuloso, nucleo de 2,5 a 3 micra.

Quando os tigmocitos são coloridos pelo método de Romanowski, Giemsa, May-Grünvald e outras variantes, apresentam o protoplasma palido, hialino, vacuolar, tornando muito fracamente as substancias corantes. O nucleo é ovoide, geralmente central, ás vezes periferico, com membrana nuclear delgada e bem visivel. Poucas massas de cromatina aderem á membrana nuclear. Dentro do nucleo a cromatina se dispõe irregularmente. Os tigmocitos apresentam-se em tamanhos diferentes: os que se encontram em maior numero têm 10 a 12 micra de tamanho e possuem nucleo de 4 micra. Os de tamanho menor, mais abundantes na corrente sanguinea, medem 5 a 8 micra; os menores de 5 micra são muito raramente encontrados. Muito pouco numerosos são os de mais de 12 micra; destes os que vão até 15 micra possuem o protoplasma muitissimo palido.

A hematoxilina ferrica de Heidenhein evidencia mais o nucleo, que aparece como no Giemsa. Não possuem granulações evidenciaveis pelos métodos de Romanowski. Apresentam, depois de fixados pelo sublimado alcool, mesmo sem coloração, algumas granulações pardas, que somente poucas células possuem.

Coloridos pelo lugol não apresentam particularidades.

HISTIOCITOS GRANULARES (do sangue de *Uca pugnax brasiliensis*)

(Figs. 1, 2 e 3)

Outras células descritas em sangue de outros crustaceos que são aproximadamente correspondentes aos histiocitos granulares de *Uca pugnax brasiliensis:*

— « Globules sanguins » de Bruntz, 1905.

— « Granular cells » de Lowitt.

— « Coarsely granular cells » de Hertzmann, 1873.

— « Amebocits » (?) de Tait & Gunn, 1918.

— « Amibocytes » (?) de Cuenot, 1895.

O exame a fresco mostra: no sangue de *Uca pugnax brasiliensis* os histiocitos granulares são as maiores células encontradas e constituem 60% do total dos elementos figurados. Medem em média desde 9 até 12 micra de diametro. São células de contorno ovoide ou esferico apresentando na massa central do endoplasma numerosos grãos em média com 1 a 2 micra cada um. Os grãos extraordinariamente grandes medem 3 a 4 micra, geralmente são ovoides, ou de contorno poligonal, mas sempre com as quinas arredondadas. Em cada célula ha aproximadamente desde 20 até uns 60 grãos.

A camada de protoplasma que envolve os grãos é imperceptivel em alguns locais e excedente em outros. Os grãos de *Uca pugnax brasiliensis* medem em média 1 micra, sendo de tamanho mais ou menos uniforme, raio de 2 ou mais micra. Poucas células se apresentam com pequeno numero de grãos, raras são as que os possuem ainda pequenos. A's vezes o nucleo é perceptivel em exame a fresco, outras vezes é invisivel pelos grãos que estão por cima.

Tait & Gunn observaram que quando se examina os histiocitos granulares em filamentos removidos das branquias de *Astacus fluviatilis* eles mudam de forma, emitem pseudopodos, possuem movimentos ameboides e foram por estes autores denominados de « amebocitos ». Os histiocitos granulares de *Uca pugnax brasiliensis* não apresentam estes movimentos ameboides, ou se os apresentam, estes se pronunciam tão pouco que nos impediu de o denominarmos de « amebocitos » e seguir a antiga denominação referida por Tait « granular cells » dada por Bruntz para estes elementos no sangue da lagosta.

Os « amebocitos » do camarão nobre de pés vermelhos, europeu, dagua dôce, *Astacus fluviatilis* Fabricius, mostram um alto poder de aderencia um para com outro, tanto em vivo como em vitro. Numa hemorragia de crustaceo, por exemplo em *Gammarus* (amphipoda) vêm-se enormes trombos constituidos quasi unicamente de amebocitos. No sangue de *Uca pugnax,* entre lamina e laminula, não ha esta aderencia de histiocitos granulares; os elementos do sangue se aglomeram em faixa, levados pelas correntes de liquido na preparação microscopica no fim de algum tempo, o que é visto principalmente em exame com objetiva fraca. Com objetiva forte observamos que a aderencia não se dá apenas nos histiocitos granulosos entre eles, mas entre os tigmocitos e histiocitos granulares indiferentemente. Além disso, a maior parte se conserva livre.

Estas células quando coloridas pelo método de Giemsa apresentam-se como elementos ovoides ou esfericos de 10 a 12 micra, ás vezes um pouco maiores ou um pouco menores, tendo no protoplasma numerosas massas (os grãos) corados uniformemente em roseo, deixando aparecer o ectoplasma em alguns locaes (figs. 1 e 2). Além destes grãos que medem em média 1 a 2 micra cada um, algumas células apresentam umas granulações finissimas semelhantes a um precipitado. Essas granulações de côr acastanhada só aparecem em algumas células, e não sabemos a que referi-las. Outra pontuação muito tenue que recobre por vezes certas células é formada por granulações neutrofilas.

O nucleo apresenta quando em repouso a seguinte forma: ovoide, medindo 4,5 micra no seu diametro maior. E' de posição central ou sub-central. Possue uma membrana nuclear visivel á qual aderem alguns grãos de cromatina. No interior notam-se algumas (duas a quatro, raro mais) massas de cromatina ligadas umas ás outras por faixas menos coradas (fig. 3), podendo assumir ás vezes formas em bastonetes.

Cuenot já em 1895, foi o primeiro a verificar divisões por mitose em globulos sanguineos de decapodos. Na maioria dos histiocitos de *Uca pugnax* o nucleo se acha em repouso apresentando cromatina periferica presa á membrana nuclear e tendo no seu interior duas massas coraveis pela hematoxilina. Vêm-se em poucos histiocitos (8 a 10%) outros nucleos numa fase mais adeantada da mitose: ha um começo de individualisação dos cromosomas; o nucleo neste estado toma o aspéto de um crivo pontuado por granulações de cromatina muito regularmente distanciadas. Em outras células estas massas de cromatina já estão dispostas em fileiras e em outras já podemos perceber um começo

de placa equatorial. E' de ser notado que no sangue colhido da pinça do crustaceo poucas formas com membrana nuclear desaparecida e em franca metafase se apresentem, estando a maioria dos histiocitos granulares com nucleo em repouso.

Lowitt começou em 1891 a descrever varias afinidades corantes dos glóbulos granulares do sangue de crustaceo. Granulações neutrofilas foram observadas em grande numero de glóbulos granulosos de varios crustaceos. Existem, como dissemos, em *Uca pugnax brasiliensis*, sendo que dão a reação de Millon, são soluveis em alcalis e acidos fracos e com iodo tomam a coloração pardo escura.

Uma reação que dá positiva no sangue de *Uca pugnax brasiliensis* é a seguinte: depois de um tratamento mais demorado pelo acido osmico a célula toma uma aparencia interessante — os grãos desaparecem, ficando a parte mais proeminente apenas; tratando-se pela eosina em seguida ha coloração das outras partes, deixando em vasio os lugares dos grãos, que parecem ter se dissolvido.

E', quando colorido pelo lugol, que os histiocitos granulares se tornam mais visiveis.

Ha elementos que são encontrados no sangue em pequeno numero em estado normal, aparecendo uma vez ou outra quando se corre o preparado, como por exemplo: Histiocitos granulares anucleados, que são elementos pouco menores que os histiocitos granulares nucleados e possuindo o mesmo aspéto. Não sabemos se se trata de um elemento que indique alguma alteração na saúde do crustaceo, pois aparece em porcentagem muito pequena no sangue normal. Possuem enormes grãos de 1 a 3 micra, não apresentam granulações neutrofilas, nem outras.

Os glóbulos de gordura somente existem em proporção muito pequena, vistos em exame a fresco, em poucas amostras.

Não encontramos histiocitos basofilos no sangue de animais normais de *Uca pugnax brasiliensis*.

Além destas formas reconhecemos no sangue tigmocitos e histiocitos granulares em via de evolução, bem como varias células em degenerescencia.

Ao terminar o nosso trabalho lembramos que Tait & Gunn (7) levantaram a hipótese, não satisfatoriamente provada, que os « explosive body » do sangue de *Astacus fluviatilis* na corrente sanguinea se transformam em tigmocitos e estes pela aquisição de grãos em histiocitos granulares.

Nós, devido á semelhança do nucleo dos tigmocitos e histiocitos granulares de *Uca pugnax brasiliensis*, achamos ser possivel a evolução de tigmocito em histiocito granular, neste crustaceo.

BIBLIOGRAFIA

1) Cuenot, L.

1897. Les Globules Sanguins et les Organes Lymphoides des Invertebrés. Arch. d'Anat. Microsc., **1** : 153.

2) Cuenot, L.

1905. L'Organe Phagocitaire des Crustacés Decapodes. Arch. Zool. Exper. ser. 4, **3** : 1.

3) Bruntz, L.

1906. Les Globules Sanguins des Crustacés Arthrostracés. C. R. Soc. Biol. Paris, **9**, 384.

4) Bruntz, L.

1907. Études sur les Organes Lymphoides Phagocitaires et Excreteurs des Crustacés Superieurs. Arch. Zool. Exp. et Gen. 4ème sér., **7** : 1-67.

5) Kollmann

1908. Recherches sur les Leucocytes et le Tissu Lymphoide des Invertebrés. Ann. Sci. Nat., **8**, Paris.

6) Knover, H. M. E.

1908. A new Sensitive Method of Injecting the Vessels of Small Embryos... Anat. Rec., **2** : 207-214.

7) Tait. J. & Gunn, J. D.

1917. The Blood of *Astacus Fluviatilis*. Quart. Journ. Exper. Phys., **12** (1) : 35-80.

8) Betarces, L.

1920. Sur l'Existence des Plaquetes chez *l'Astacus fluviatilis*. C. R. Acad. Sci. Paris, **171** : 320-322.

9) Arton, C.

1927. Gli Elementi dell'Endolinfa dei Crostacei Eufilopodi. Rend. Acc. Lincei., **6** (6) : 257-260.

10) Oliveira, L. P. H.

1939. Contribuição ao Conhecimento dos Crustaceos do Rio de Janeiro. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **34** (1) : 115-148, 14 est.

11) Sawaya, P.

1939. Sobre a Mudança de Côr nos Crustaceos. Bol. Fac. Fil. Cien. Letras da Univ. S. Paulo, **13** (3) : 1-109.

12) Langeron, M.

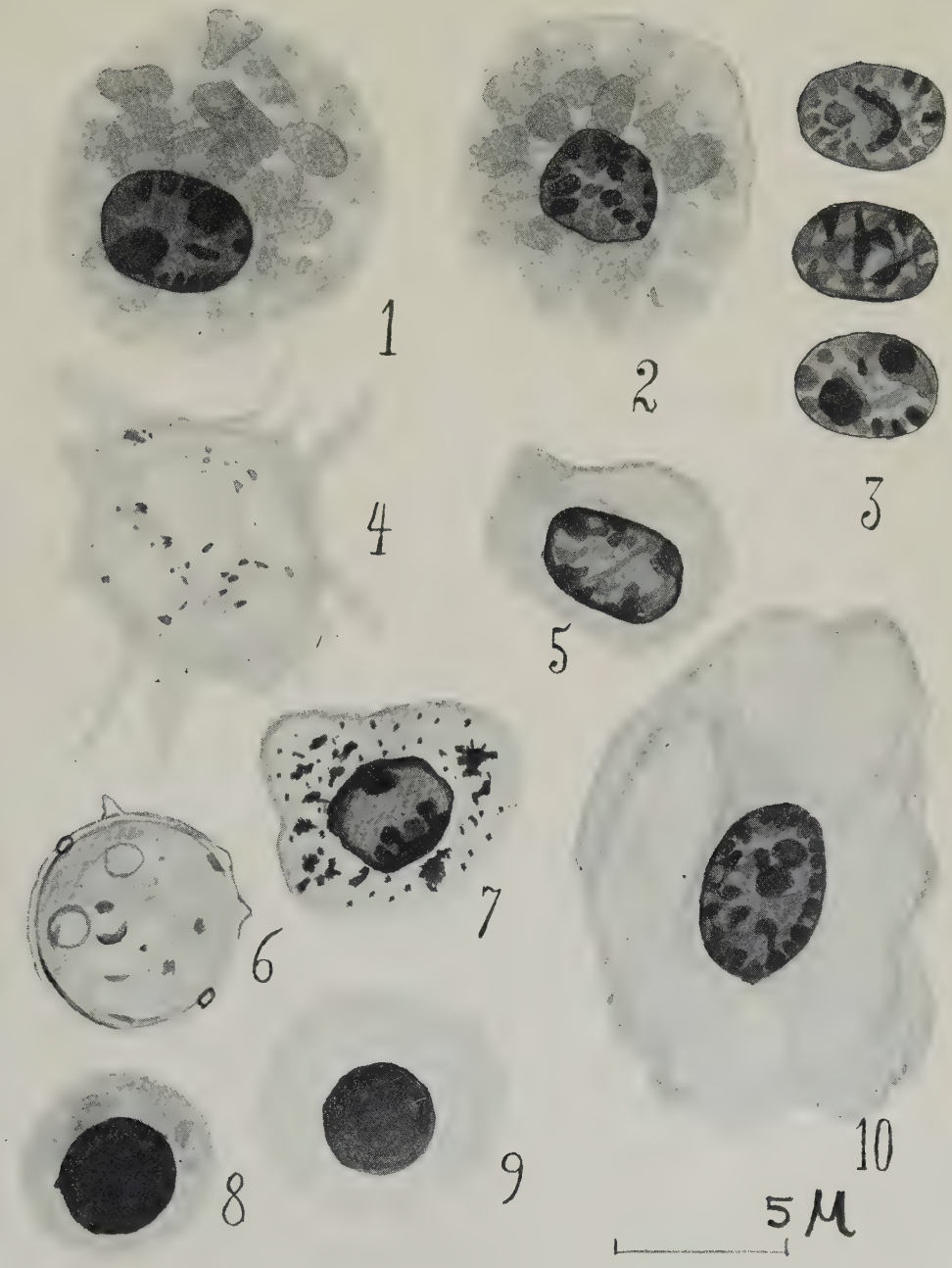
1936. Précis de Microscopie. Masson & Cie., Paris.

13) Oliveira, L. P. H.

1940. Catalogo dos Crustaceos do Rio de Janeiro. Mem. Inst. Osw. Cruz, **35** (1) : 137-151.

Estampa 1

Fig. 1 — Histiocito granular, colorido pela Hematoxilina ferrica de Heidenhein.
Fig. 2 — Idem.
Fig. 3 — Nucleos de histiocitos granulares.
Fig. 4 — Exame a fresco, mostrando o aspéto « estrelado » com que fica o tigmocito.
Fig. 5 — Tigmocito colorido pela Hematoxilina ferrica.
Fig. 6 — Exame a fresco, mostrando o aspéto esferico com que fica o tigmocito.
Fig. 7 — Tigmocito colorido pelo Heidenhein.
Figs. 8-9 — Jovens tigmocitos.
Fig. 10 — Um grande tigmocito.



Oliveira e Moreira: Sangue de Crustaceos.

SERVIÇO DE ESTUDO DAS GRANDES ENDEMIAS
Superintendente: Dr. E. Chagas

Criação de flebotomos e transmissão experimental da Leishmaniose visceral americana *

por

A. W. Chagas

(Com 5 estampas)

Criação de F. intermedius:

A criação de flebotomos para fins experimentais foi iniciada, nos laboratorios do Instituto Oswaldo Cruz, nos ultimos dias de Maio de 1938. Com o intuito de conseguir uma fonte constante de adultos, tanto para fins de criação como para experiencias de transmissão, foi colocada uma armadilha (fig. 1) em um galinheiro situado na encosta de uma colina coberta de mata densa no bairro das Laranjeiras (fig. 2), que passou a fornecer diariamente regular quantidade de insetos. Estes, transportados todas as manhãs aos laboratorios, eram separados por sexo, e as femeas divididas em dois grupos: as que se mostravam vazias de sangue e as que se achavam cheias. As femeas vazias eram utilizadas em experiencias de transmissão e as cheias colocadas em tubos de hemolize tampados com rolhas de algodão e forrados com papel de filtro humedecido (fig. 3), em numero de duas e três por tubo, para aguardar a desova. Os machos eram desprezados na sua maioria, mas um pequeno numero era colocado em uma gaiola onde se juntavam as femeas vazias que se recusassem a sugar.

Geralmente a desova das femeas trazidas cheias se processou ao 3.º dia, e a ela, na maioria dos casos, seguiu-se a morte do inséto.

A 30 de Maio, o papel de filtro que forrava um tubo de hemolize foi retirado com os ovos postos no dia anterior e colocado em placa de Petri (fig. 4) para aguardar a saída das larvas (fig. 5). Saídas estas a

* Recebido para publicação a 26 de Fevereiro de 1940 e dado á publicidade em Agosto de 1940.

5 de Junho, foram alimentadas com uma mistura a 10 : 1 de fezes de cobaia e sangue de coelho, ambos sêcos em estufa e pulverizados. As larvas (fig. n.º 6) alimentaram-se sempre perfeitamente e se desenvolveram normalmente, empupando (fig. 7) as primeiras a 2 de Julho. A 9 de Julho nasceu o primeiro adulto: um macho (fig. 8). A média de tempo de evolução de postura a adulto foi de 43 dias, distribuidos como segue: de postura à eclosão dos ovos, 7 a 9 dias; fase larvaria, 27 a 28 dias; fase pupal, 7 a 9 dias.

A criação foi levada excepcionalmente até a terceira geração, mas os ovos postos pelas femeas desta geração e a maioria dos ovos das femeas de segunda geração não ecloiram. A criação foi mantida até Junho de 1939, mas visto não haver animal infectado para continuação das experiencias de transmissão, foi descontinuada. Damos abaixo a relação dos flebotomos capturados na armadilha e criados no laboratorio de Junho de 1938 a Julho de 1939.

Quadro 1

Flebotomos

Mês	*Intermedius*				*Longipalpis*	
	Capturados em armadilha		Criados no laboratorio		Criados no laboratorio	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Junho, 1938	1230	252				
Julho	392	97	79	82		
Agosto	1050	411	231	215		
Setembro	706	277	88	103	4	1
Outubro	185	42	731	803	0	0
Novembro	535	34	53 *	88 *	13	14
Dezembro	198	31	28	25	16	11
Janeiro, 1939	60	47	17	13	1	4
Fevereiro * *	2	2	39	56		
Março * *	76	20	169	195		
Abril * *	114	28	88	84		
Maio * *	189	21	26	29		
Junho * *	7	4	85	82		
Julho			39	35		
Agosto			2	7		
Total	4744	1266	1675	1817	34	30

* O aparelho de ar condicionado deixou de funcionar e esteve em concerto por cerca de 10 dias. Em consequencia, só algumas larvas nos estadios mais avançados sobreviveram.

* * Nestes mêses, por motivos alheios a nossa vontade, as capturas foram feitas com interrupções: em Fevereiro houve capturas apenas uma semana, em Março e Abril duas semanas e em Maio e Junho três semanas.

Todos os dias os flebotomos nascidos em laboratorio durante as 24 horas precedentes eram liberados em gaiolas pequenas (fig. 9) for-

radas no fundo com panos que sempre eram mantidos molhados e contendo duas pequenas vasilhas, uma com algodão embebido em agua e outra com algodão embebido em uma solução muito fraca de mel de abelha. Ao fim do primeiro dia eram retiradas as femeas, uma ou duas por tubo de hemolize, e no proprio tubo eram postas para se alimentar (fig. 10). Todas as que não se alimentavam eram soltas de novo na mesma gaiola onde diariamente eram liberados alguns machos capturados em natureza. Segunda tentativa de alimentação era feita no dia imediato, e no terceiro dia, si a femea continuasse a recusar alimento, era guardada separada em um tubo de hemolize até que se alimentasse ou morresse. Em um mês de experiencias sómente três se alimentaram ao fim do primeiro dia, poucas no segundo dia, e a grande maioria no terceiro dia de vida adulta. Poucas fizeram uma segunda refeição antes de desovarem, e apenas uma desovou duas veses, tendo se alimentado pela terceira vês logo após a primeira desova. Esta se dava em tempo muito variavel depois da primeira refeição, de três a sete dias, sendo a média de cinco dias.

Nos mêses de Junho e Julho, approximadamente a metade das femeas de flebotomos, tanto as capturadas em natureza como as criadas em laboratorio, se alimentaram em cães infectados. No mês de Agosto houve uma reducção consideravel no numero das que se alimentaram, e nos mêses subsequentes, embora continuassemos usando a mesma tecnica empregada em Junho e Julho, a diminuição foi ainda maior. Tentamos então varias modificações na hora de alimentação, sem, comtudo, obter resultados favoraveis, como se vê no quadro abaixo:

Quadro 2

Alimentação de flebotomos

Mês	Femeas capturadas vazias	Femeas de criação	Total de femeas usadas	Femeas que se alimentaram	o/o de femeas que se alimentaram
Julho, 1938	48	82	130	66	50.8
Agosto	45	215	260	68	26.1
Setembro	67	103	170	22	12.9
Outubro	28	803	831	84	10.1
Novembro	14	88	102	14	13.7
Dezembro	16	25	41	6	14.6
Janeiro, 1939	13	13	26	5	19.2
Fevereiro	2	56	58	2	3.6
Março	7	195	202	13	6.4
Abril	18	84	102	16	15.7
Maio	17	29	46	11	24.0
Junho	1	82	83	11	14.2
Total	276	1775	2051	318	

Com o intuito de verificar qual a relação existente entre as condições de clima e a quantidade de flebotomos capturados, as temperaturas maxima e minima foram tomadas no local de capturas em Laranjeiras durante seis mêses a começar pelo mês de Julho de 1938, com os seguintes resultados:

Quadro 3

Mês	N. de flebotomos capturados	*Temperatura*			
		Media		Absoluta	
		Mx.	Mn.	Mx.	Mn.
Julho 1938	489	20.4	15.5	24.0	13.0
Agosto	1461	22.6	17.0	28.0	15.0
Setembro	983	23.9	18.2	31.0	14.0
Outubro	227	24.0	19.1	27.0	16.0
Novembro	569	26 7	20.4	32.0	17.0
Dezembro	229	27.4	21.1	33.0	17.0

Constatou-se durante os mêses de Julho a Setembro que a temperatura variava consideravelmente e que o registo diario da maxima e minima dava noção incompleta quanto às verdadeiras condições de temperatura. Foram, portanto, instalados aparelhos para um registo horario da humidade, pressão atmosferica e temperatura, como se vê no quadro 4.

Temendo o efeito do calor intenso do verão sobre a criação de flebotomos, foi instalado em Outubro um aparelho para conservar a temperatura da sala de criação sempre entre 22 e 24° C., com humidade acima de 80, visto que no fóco em Laranjeiras eram estas as condições. Em vista do numero reduzido de flebotomos criados no laboratorio, julgamos que a temperatura aí era ainda alta.

Criação de F. longipalpis:

Tentamos tambem a criação de *F. longipalpis* com ovos postos por femeas capturadas em natureza e enviadas do Pará. Destes conseguimos 30 femeas, mas apenas oito se alimentaram uma vês, morrendo ao cabo de três a seis dias sem desovar. O método de criação empregado foi o mesmo usado para os *F. intermedius*, com uma excepção: as placas contendo larvas de *F. longipalpis* foram sempre conservadas na temperatura ambiente e não na sala refrigerada.

Quadro 4

Mês	Flebotomos capturados	*Humidade*			*Pressão barometrica*			*Temperatura*		
		Mn.	Media semanal	Mx.	Mn.	Media semanal	Mx.	Mn.	Media semanal	Mx.
1938										
Out. 12-16	84	72	82	86	558	762	768	20	21	23
17-23	13	73	86	95	754	760	766	23	22	24
24-30	34	64	88	100	755	760	762	19	23	25
31- 6	46	55	85	100	754	758	760	21	24	28
Nov. 7-13	54	63	90	100	750	758	760	18	23	29
14-20	88	65	90	100	752	756	761	20	23	31
21-27	230	48	75	100	750	758	762	21	24	30
28- 4	175	55	80	100	745	752	763	22	24	29
Dez. 5-11	53	57	90	100	747	755	759	18	23	26
12-18	41	58	88	100	750	753	758	20	25	29
19-25	39	73	94	100	749	752	758	23	24	27
26- 1	71	72	96	100	751	755	761	19	23	26
1939										
Jan. 2- 8	16	72	94	100	751	756	761	20	23	26
9-15	46	I N S T R U M E N T O S E M C O N C E R T O S								
16-22	28	52	85	99	751	754	758	21	26	32
23-28	16	55	83	98	746	752	756	22	25	30
30- 5	25	80	95	100	746	752	759	20	23	27
Fev. 6-12		54	81	96	754	756	759	21	25	30
13-19		55	87	100	753	756	758	22	24	31
20-26		55	81	98	753	757	759	23	26	31
27- 5	43									
Mar. 6-12	8									
13-19	25		INSTRUMENTOS							
20-26	23					EM				
27- 2										
Abr. 3- 9	Capturas suspensas						CONCERTO			
10-16	15	81	93	100				22	24	26
17-23	49	34	94	100	757	759	761	18	19	22
24-30	78	76	95	100	752	755	758	20	22	24
Maio 1- 7	74	75	93	100	752	756	760	18	20	23
8-14	116	65	92	100	748	753	758	21	22	25
15-21		82	94	100	753	757	760	20	22	24
22-28	18	64	92	99	757	759	762	18	21	23
29- 4	7	80	85	100	754	756	761	19	21	22
Jun. 5-11	0	63	91	99	750	757	762	15	19	22
12-18	4	68	94	100	755	761	764	15	18	21
19-25	1	82	95	100	755	758	760	16	19	22

INFECÇÃO DE FLEBOTOMOS

Como se vê no quadro abaixo, durante onze mêses foram alimentadas um total de 274 femeas de *Flebotomus intermedius* em cães infectados com *L. chagasi*. Destas, 231 femeas foram alimentadas em cães experimentalmente infectados e 43 em um cão naturalmente infectado. Das primeiras, 146 foram examinadas, não se apresentando nenhuma com leptomonas. Durante o mês de Outubro, embora tivessemos muitos flebotomos adultos, não foi possivel utilisa-los, por falta de cão infectado, visto ter morrido o ultimo em meiados de Setembro.

Em principios de Novembro, porém, foi trazido de Piratuba, Pará, um cão encontrado infectado em natureza (Cão « Não te importes »), e retomamos as experiencias. Das 20 femeas de *F. intermedius* que se alimentaram durante Novembro e Dezembro, três apresentaram flagelados com forma de leptomonas, uma no 6.º e duas no 3.º dia depois da refeição. Das 23 que se alimentaram de Janeiro a Abril, oito se infectaram.

Dos adultos *longipalpis*, conseguimos que 8 femeas se alimentassem no cão « Não te importes ». Examinadas 3 1/2 a 6 dias após a refeição, seis se apresentavam com flagelados com forma de leptomonas no tubo digestivo.

Quadro 5

Infecção de flebotomos

Mês	*Intermedius*			*Longipalpis*		
	Alimentados	Examinados	Posit.	Alim.	Exam.	Posit.
Junho, 1938	75	46	0			
Julho	66	40	0			
Agosto	68	55	0			
Setembro	22	15	0			
Outubro	0	0	0			
Novembro	14	12	4	4	2	2
Dezembro	6	5	0	2	4	4
Janeiro – Abril, 1939	23	19	8	2	2	0
Total	274	192	21	8	8	6

Em meiados de Janeiro recebemos uma remessa de hamsters para experiencias sobre a transmissão da leishmaniose visceral americana. Visto já estar extinta a colonia de *F. longipalpis* só pudemos utilisar os *F. intermedius*. Dos oito infectados de Janeiro a Abril, sete foram inoculados

em dois hamsters: três em um e quatro em outro, como se vê no quadro abaixo:

Quadro 6

Flebotomos utilizados para inoculação

Procedencia do *F. intermedius*	Data e hora da alimentação	Data de exame	Resultado	Inoculado em Hamster n.
Laboratorio	23-1-39, 16:00	27-1-39	+	2769
«	24-2-39, 14:30	28-2-39	+	2769
«	27-2-39, 16:00	28-2-39	—	
«	4-3-39, 15:30	8-3-39	+	2769
«	9-3-39, 15:00	11-3-39	—	
«	9-3-39, 15:00	13-3-39	—	
«	9-3-39, 15:00	14-3-39	—	
«	10-3-39, 15:00	13-3-39	—	
«	10-3-39, 15:00	14-3-39	—	
«	13-3-39, 15:00	16-3-39	+	Não aproveitado
«	23-3-39, 16:00	27-3-39	—	
«	23-3-39, 16:00	28-3-39	+	2799
Natureza *	23-3-39, 16:00	29-3-39	+	2799
Laboratorio	27-3-39, 15:30	31-3-39	—	
«	28-3-39, 15:30	2-4-39	—	
«	11-4-39, 16:30	17-4-39	+	2799
«	11-4-39, 16:30	17-4-39	—	
«	12-4-39, 15:30	17-4-39	++	2799

* Capturado em Laranjeiras onde não ha Leishmaniose Visceral Americana.

Os resultados das inoculações confirmaram a capacidade de transmissão da Leishmaniose visceral americana pelo *F. intermedius* como se pode ver pela exposição feita com o Dr. Lobato Paraense em nota publicada no Brasil-Medico do qual transcrevemos o seguinte trecho:

« 1) Hamster n. 2769, inoculado a 27-1-39 com triturado de um *F. intermedius* de criação alimentado a 23-1-39 no cão « Não Te Importes », naturalmente infectado com *L. chagasi*. Reinoculado a 28-2-39 com um *F. intermedius* tambem de criação, alimentado a 24-2-39. Reinoculado a 8-3-39 com um *F. intermedius* de criação que havia sugado a 4-3-39. Estes tres flebotomos apresentavam raros flagelados com forma de leptomonas no tubo digestivo.

« 2) Hamster 2799, inoculado a 28-3-39 com triturado de um *F. intermedius* de criação, alimentado a 23-3-39 no cão « Não Te Importes ». Reinoculado a 29-3-39 com triturado de um *F. intermedius*, capturado em natureza e que havia sugado no dia 23. Reinoculado a 17-4-39 com dois *F. intermedius* de criação, alimentados a 12-4-39 e 13-4-39 respectivamente. Destes, tres apresentavam raras leptomonas no tubo digestivo, emquanto o quarto flebotomo, femea de criação alimentada a 12-4-39, apresentava abundantes leptomonas.

« O Hamster 2769 morreu a 23-3-39. Os esfregaços de figado, baço e medula ossea foram negativos, assim como os córtes dos orgãos.

« O Hamster 2799 foi conservado em observação até 8-1-40. Nesse dia fizemos a biopsia da péle da coxa esquerda, com resultado positivo, tendo sido encontradas rarissimas Leishmanias em alguns dos córtes examinados. A 12-1-40 puncionamos o figado, encontrando maior abundancia de parasitos.

« Este ultimo animal morreu a 20-1-40, e o exame microscopico dos orgãos confirmou a existencia da infecção.

SUMARIO

Foi conseguida a criação em laboratorio do *Flebotomus intermedius* e foram obtidos, de ovos colhidos em natureza, alguns *F. longipapis*. 231 femeas *F. intermedius* alimentadas em cães experimentalmente infectados pela *Leishmania chagasi* não se infectaram, emquanto que de 43 femeas alimentadas em um cão naturalmente infectado, 12 se infectaram; de 8 *F. longipalpis* que sugaram este cão, 6 se infectaram.

O triturado de 3 *F. intermedius* apresentando flagelados com forma de leptomonas foi inoculado em um hamster, e o de 4 *F. intermedius* em outro. O segundo hamster, examinado nove mêses após a primeira inoculação, mostrou-se infectado.

Estampa 1

Fig. 1 — Armadilha para captura de flebotomos.
Fig. 2 — Local ao lado do galinheiro.

Fig. 1

Fig. 2

Chagas: Transmissão experimental da Leishmaniose visceral.

Estampa 2

Fig. 3 — Tubos para a desova das femeas.
Fig. 4 — Placas de Petri com as tiras de papel de filtro retiradas dos tubos de desova.

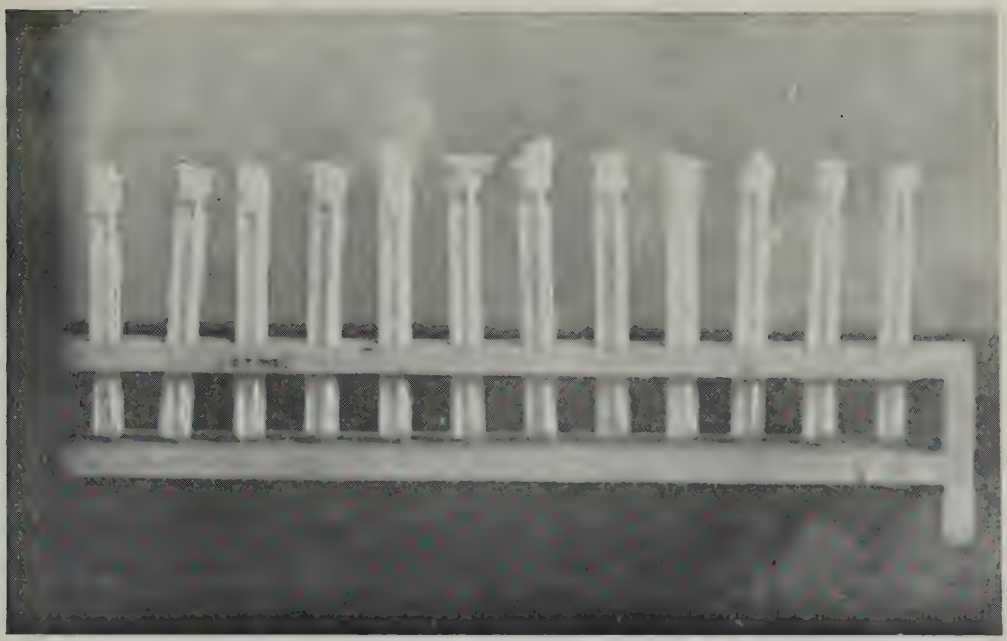


Fig. 3

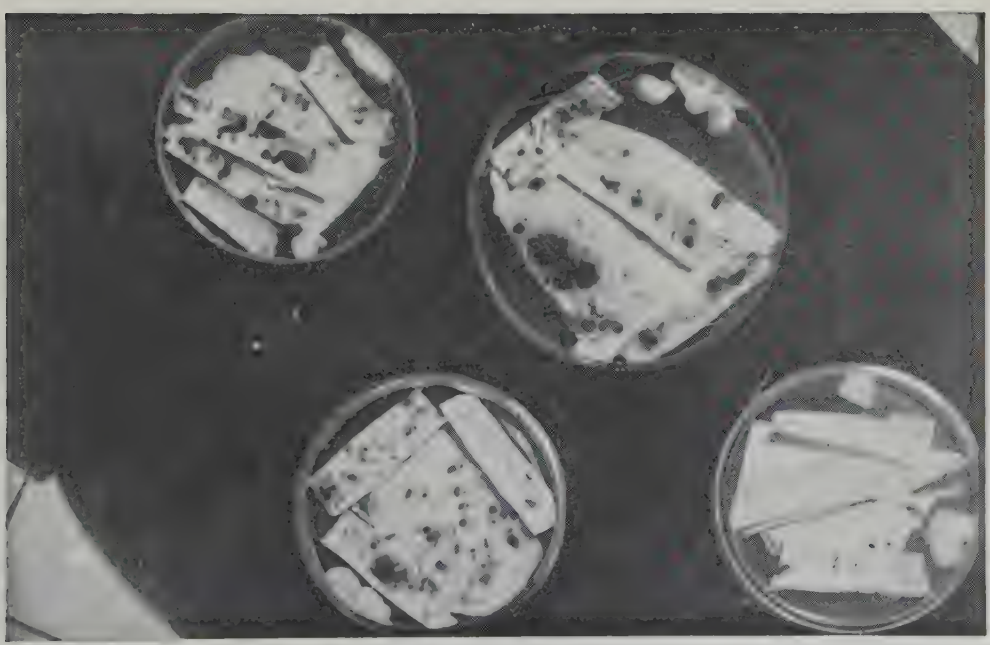


Fig. 4

Chagas: Transmissão experimental da Leishmaniose visceral.

Estampa 3

Fig. 5 — Larva que morreu na eclosão.
Fig. 6 — Larva no ultimo estadio.

Fig. 5

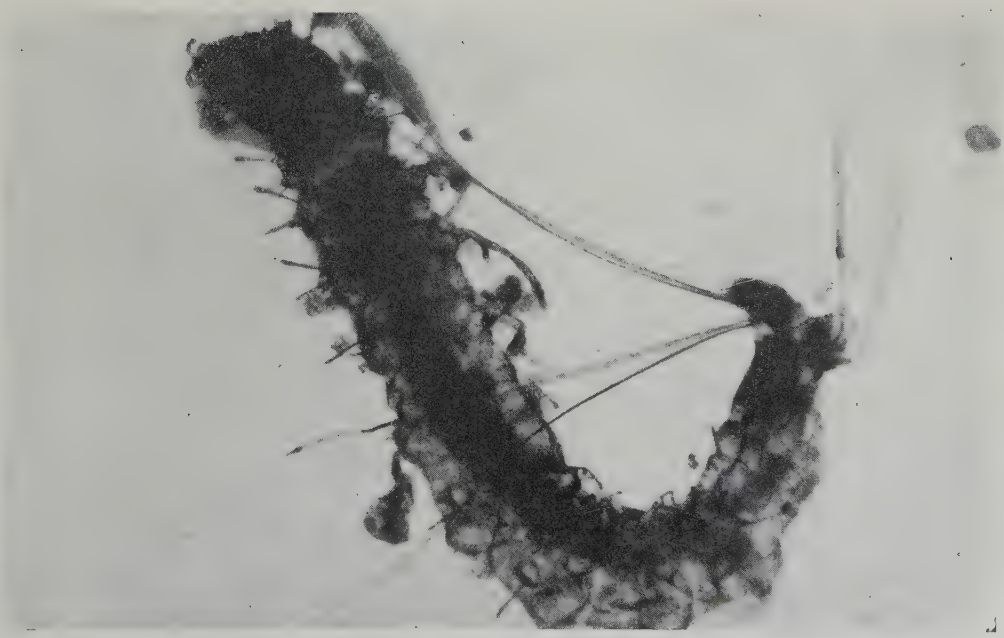


Fig. 6

Chagas: Transmissão experimental da Leishmaniose visceral.

Estampa 4

Fig. 7 — Pupa de *F. intermedius*.
Fig. 8 — *F. intermedius* adulto.

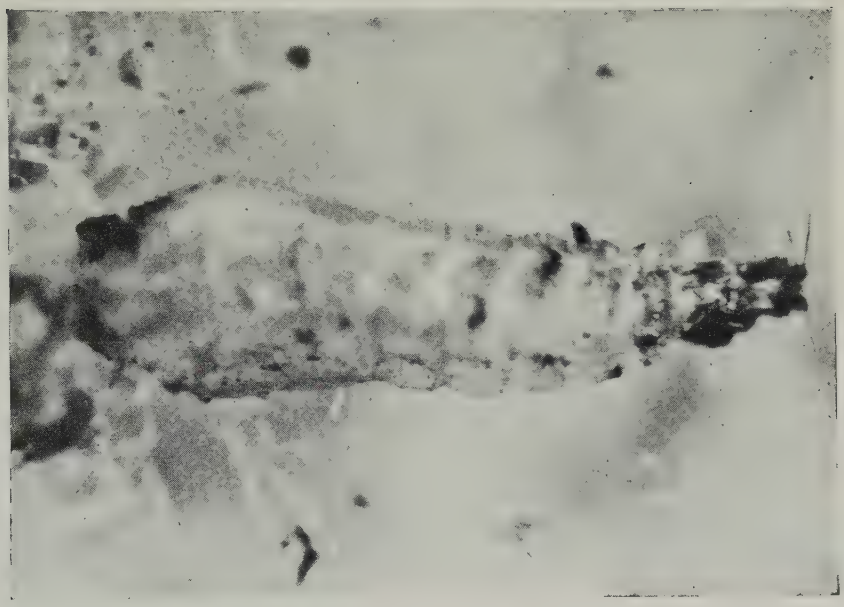


Fig. 7

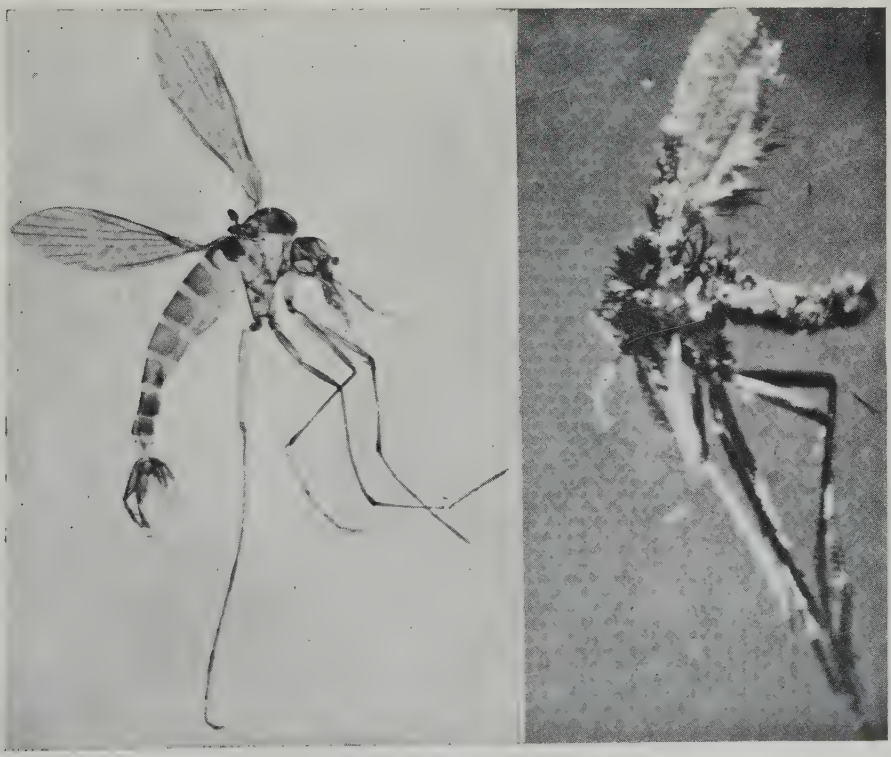


Fig. 8

Chagas: Transmissão experimental da Leishmaniose visceral.

Estampa 5

Fig. 9 — Gaiola para criação de flebotomos.
Fig. 10 — Alimentação de flebotomos em um cão infectado.

Fig. 9

Fig. 10

Chagas: Transmissão experimental da Leishmaniose visceral.

Técnica do xenodiagnostico na molestia de Chagas *

pelo

Dr. Emmanuel Dias

(Instituto Oswaldo Cruz)

(Com 2 estampas)

A enorme importancia que tem adquirido o estudo da tripanosomose americana, doença de Chagas ou esquizotripanose, torna muito oportuna a descrição dos métodos de laboratorio aplicaveis ao diagnostico da enfermidade, dentre os quais os mais importantes e decisivos são, sem duvida, aqueles que visam a demonstração, direta ou indireta, do *Schizotrypanum cruzi* no sangue do homem ou dos animais.

Processo indireto dos mais recomendaveis é a « prova do barbeiro » ou xenodiagnostico, que consiste em verificar-se si barbeiros « puros » infectam-se após haverem sugado o sangue de um suposto portador.

No presente trabalho tencionamos dar uma descrição pratica e detalhada deste método que, proposto por Brumpt em 1914, vem encontrando cada vez maior aplicação por parte dos pesquizadores e clinicos que lidam com a tripanosomose de Chagas.

INSETOS

A primeira condição para o emprego rigoroso do xenodiagnostico é a garantia da pureza dos insetos utilisados, os quais devem provir de criação no laboratorio e ser completamente isentos de qualquer infecção por flagelados. Do cultivo das principais especies de barbeiro, que é facilmente conseguido e mantido, tratámos especialmente em trabalho anterior (Dias, 1938).

Para constante garantia da pureza de uma criação de reduvideos julgamos indispensaveis as seguintes normas: 1.ª) empregar para alimentação animais de laboratorio ainda não usados, de preferencia pombo ou cobaio; 2.ª) nunca readmitir na criação barbeiros que tiverem estado em contacto com pessoas ou animais possivelmente infectados, mesmo quando aparentemente não tenham ingerido sangue suspeito; 3.ª) nunca introduzir na criação insetos de outra procedencia; 4.ª) controlar

* Recebido para publicação a 18 de Março de 1949 e dado á publicidade em Agosto de 1940.

periodicamente os barbeiros, examinando-lhes as dejeções ou o conteúdo intestinal.

Verificado em um unico barbeiro a existencia de flagelados, o *stock* de onde ele proveio estará perdido para fim de xenodiagnostico, devendo a criação ser recomeçada a partir de ovo. Tal eventualidade nunca ocorreu em nosso laboratorio, onde ha anos mantemos criações normais, observando estritamente as normas acima.

A *especie* de reduvideo a ser utilisada não é indiferente, pois já verificámos que especies diversas podem ter receptividade variavel para diferentes amostras de *Schizotrypanum cruzi*. Assim, não só foi demonstrado que uma amostra brasileira deste parasito infectava *P. megistus*, *E. sordida* e *T. infestans* em percentagens significativamente maiores do que *Rhodnius prolixus* (Dias, 1939), como tambem amostras venezuelanas de *S. cruzi* evoluiram em maior percentagem de *Rhodnius prolixus* normais, do que em *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans*. *Deve preferir-se, para o xenodiagnostico em determinada região, uma especie local, ou melhor, o transmissor natural mais importante da molestia, nessa região.*

A *idade* mais conveniente dos barbeiros destinados á prova deve ser média — « larvas já de certo tamanho ou ninfas, não só pela quantidade relativamente grande de sangue que já podem sugar, como pela pequena mortalidade nessa fase e o longo tempo que podemos esperar para sua observação » (Dias, 1936, p. 107).

Numero — Afim de que sejam maiores as possibilidades de se conseguirem resultados positivos, ou de que tenham maior significação os resultados negativos, devemos procurar usar em cada prova sempre um certo numero de barbeiros. Via de regra usam-se de cada vês 3 a 6 exemplares, podendo o numero aumentar ou diminuir conforme o interesse do momento.

Larvas vasias e famintas devem ser de preferencia escolhidas para uso, pois terão maior probabilidade de realisarem uma sucção mais rapida e mais completa do que as ainda parcialmente cheias. E' muito facil reconhecer-se quando o barbeiro está apto a sugar em dado momento: introduzindo-se o dedo por algum tempo no recipiente onde eles se acham, os mais famintos logo se aproximam estirando a tromba, sendo então recolhidos.

APLICAÇÃO

Ha diversas maneiras simples de se colocarem os barbeiros de prova para sugar, podendo eles ser postos diretamente sobre a péle, livres ou

encerrados em um recipiente qualquer. Dispositivos praticos, adaptações de outros empregados na alimentação de piolhos e de carrapatos, podem ser facilmente improvisados, como os que se vêem nas figuras 1 e 2 da estampa 1. Constam estes dispositivos de uma caixa de papelão fechada de um lado por uma tampa (de rosca preferentemente) e do outro por dupla camada de gaze segura por esparadrapo; o lado da gaze fica mantido fixo de encontro á péle do doador por meio de barbantes ou de tiras de pano. Os reduvideos realisam facilmente a refeição hematica nestas condições, que favorecem além de tudo a possibilidade da aplicação ao abrigo das vistas dos circunstantes ou mesmo das do proprio paciente.

O *tempo de aplicação* deve ser o bastante para permitir que os insetos se encham completamente de sangue. Quando varios barbeiros são usados a refeição dura em geral de 15 a 30 minutos. Tanto quanto possivel deve-se prolongar o contacto, quando se observa que os insetos insuficientemente cheios continuam a sugar ou procuram de novo introduzir a tromba. Naturalmente, maior o grau de repleção, melhor para o resultado da prova.

CONSERVAÇÃO

Após a sucção recolhem-se os barbeiros cheios para o interior de tubos de mosquito (est. 2, fig. 1), tubos de ensaio ou de Borrel, onde vão aguardar exame. Fecham-se estes tudos com rolha de cortiça, com algodão, ou melhor, com gaze dupla segura por elastico; esta ultima tem a vantagem de facilitar a evaporação das dejeções, cuja acumulação chega ás veses a danificar os reduvideos. Dentro dos tubos colocam-se tiras de papel de filtro ou de jornal dobradas, ás quais os insetos aderem.

Rótulos externos devem conter as indicações necessarias, como numero de ordem, indicação de pessoa ou animal, data, local, etc. Não é recomendavel que muitos exemplares sejam conservados juntos em pequenos recipientes.

Dos barbeiros aplicados, sómente os que nitidamente se encheram de sangue devem ser separados para exame; os que apenas sugaram pouco e os que nada sugaram não devem ser nem aproveitados na prova nem voltar para junto dos barbeiros puros. Tornam-se *suspeitos* e como tal devem ser conservados á parte ou ser destruidos.

EXAME

Quanto tempo após a aplicação devem ser examinados os barbeiros? O intervalo variará, conforme as circunstancias. Tratando-se de infecções relativamente intensas, alguns dias bastarão; mas nas infecções

pobres um prazo mais longo é necessario, afim de que os raros parasitos ingeridos possam se multiplicar a ponto de se tornarem mais facilmente encontraveis no conteúdo intestinal dos insetos.

Adotamos como regra nunca dissecar os barbeiros antes de decorrido 1 mez e consideramos tempo ótimo entre o 40.º e o 60.º dia. Um intervalo excessivamente longo não é recomendavel, pois com o correr do tempo a infecção pode desaparecer espontaneamente, conforme já tem sido observado (cf. Dias, 1934*a*, 1936*a*, 1936*b*, Dias & Romaña, 1939). Quando necessario, os barbeiros de prova devem ser alimentados em animal indene, para poderem esperar, em boas condições, o momento da dissecção.

Varias são as maneiras de se pesquisar o parasitismo nos barbeiros. O *exame das dejeções* a fresco, entre lamina e laminula, é a mais simples, mas apresenta o inconveniente da incerteza da obtenção do material no momento desejado. As dejeções podem ser mais seguramente obtidas encerrando-se barbeiros dentro de placas secas, logo depois de alimentação em animal normal. A tecnica da *punção retal* permite a qualquer instante a obtenção do conteúdo do intestino posterior, sem o sacrificio do inseto; foi por nós anteriormente descrita (Dias 1936) e consiste simplesmente na introdução da extremidade de uma pipeta capilar no orificio anal (est. 2, fig. 2). A pipeta é feita com a parte fina de pipetas estiradas comuns e sua ponta deve ser bem afilada, para poder ser introduzida sem dano. Uma vês introduzida (a pequena profundidade, devido ao curto diametro da empôla retal) o material penetra por capilaridade; uma ligeira pressão sobre o abdome favorece a obtenção do material, que será examinado em natureza ou após diluição em sôro fisiologico. Todo cuidado deve ser tomado ao se introduzir a pipeta, para que ela não rompa o revestimento externo e penetre na cavidade geral e não no réto; a punção da cavidade geral fornecerá hemolinfa, que será reconhecida ao microscopio pela presença de células (amebocitos). A punção retal é mais facilmente praticada em ninfas e larvas do que em adultos, e, quando realisada em boas condições, é perfeitamente inócua. Algumas veses a simples compressão abdominal fez com que o conteúdo retal seja expelido.

Dissecção — Nos casos em que se deseje a verificação definitiva de um resultado, ou em que não haja interesse na conservação dos barbeiros em estado vivo, é indicada a dissecção. Esta é muito facil, em razão do tamanho dos reduvideos, e tem por fim a retirada de parte do tubo digestivo para confecção de preparados. Deve ser examinado de preferencia o duodeno, ou porção intestiniforme do mesenteron, que é a porção tubular adelgaçada intermediaria entre o estomago e a em-

pôla retal (est. 2, fig. 3). E' no duodeno que os parasitos, sob a fórma de critidia, se multiplicam mais intensamente e mais precocemente.

Um modo comodo de proceder á dissecção é o seguinte: Segurando-se o barbeiro pelo tórax com uma pinça curva, corta-se a tesoura a margem do conexivo, separando-se as folhas quitinosas dorsal e ventral do exoesqueleto. Pela retirada da folha dorsal ficam a descoberto os orgãos internos in loco. Com outra pinça puxa-se para cima de uma lamina, o estomago, que se destaca facilmente pela ruptura do esofago, e distende-se com cuidado o duodeno. Pode-se então retirar este ultimo em todo ou em parte, seccionando-o em dois pontos e transportando-o para lamina onde será feita a diluição do conteúdo para exame. Esta tecnica permite o exame do material mais apropriado livre o mais possivel de impurezas e detritos, e tem ainda a vantagem de deixar o intestino posterior intacto dentro da carcassa do inseto. Sendo positivo o exame e desejando-se praticar inoculação em animal, estará preservada a ultima porção do tubo digestivo, na qual se encontram as formas infectantes do flagelado. Com alguma pratica, consegue-se sem nenhuma dificuldade a obtenção de material puro de cada um ou de todas as principais porções do conduto intestinal dos reduvideos.

REGISTRO DAS PROVAS

Para registro das provas de xenodiagnostico e dos seus resultados é vantajoso o emprego de um caderno impresso em cujas paginas encontram-se as principais indicações a serem preenchidas, referentes ao paciente, aos insetos utilisados e aos resultados dos exames. O modelo abaixo é por nós usado, em cadernos de 200 paginas com duas fichas em cada uma.

XENODIAGNOSTICO

No..... Data.....
Nome.....
Local.....
Obs.....
.....
Exame..... Data.....

Resultado

Especie	Positivos	Negativos	o/o	†
P. megistus				
T. infestans				
R. prolixus				

COMPARAÇÃO COM OUTROS PROCESSOS INDIRETOS

O xenodiagnostico, além de ser de facil aplicação, fornece resultados bastante seguros. Sensibilidade e simplicidade, são as duas vantagens basicas do processo, cuja principal desvantagem consiste no tempo que tardam os resultados a serem verificados. Este inconveniente, entretanto, é comum a todos os meios de pesquisa indireta do *Schizotrypanum cruzi*, aos quais temos que recorrer depois de exgotados os recursos dos exames diretos do sangue, a fresco ou em gotas espessas: a inoculação em animal e a cultura *in vitro*.

Destes tres processos indiretos, qual oferece maiores vantagens de praticabilidade?

Parece evidente que o xenodiagnostico é o que maiores vantagens reune, para uma aplicação pratica em maior ou menor escala. Barbeiros normais para prova são facilmente conseguidos, quer de criações feitas a proposito, quer de Instituições ou Laboratorios onde numeroso stock pode ser sempre mantido; o transporte dos insetos é o mais facil possivel, podendo os interessados receber pelo correio os exemplares de que necessitem. A aplicação dos hemipteros é a mais simples possivel, bem como sua conservação á espera de exame, o qual por sua vês não oferece dificuldades maiores. As facilidades de criação ou obtenção, de transporte, de aplicação, de conservação e de exame dos barbeiros, fazem do xenodiagnostico o meio de mais pratica aplicação, em grande escala sobretudo. Com ele não podem rivalisar a inoculação nem a cultura, cujo emprego oferece na pratica tanto maiores dificuldades quanto maior fôr a extensão que se dê ou que se procure dar ás investigações.

A inoculação, que tem sobre o xenodiagnostico a vantagem aparente de permitir a pesquisa de parasitos em maiores volumes de sangue, oferece entretanto maior numero de inconvenientes, como a dificuldade de transporte, de manutenção e de exame, que apresentam os animais de experiencia e que são sem duvida maiores do que as apresentadas pelos barbeiros. Além disto, nem sempre é facil a escolha do animal mais adequado á inoculação, que além das variações especificas oferece variações individuais de sensibilidade á infecção. A variação de virulencia do germen, não só de amostras diversas como da mesma amostra, é outro fator que se deve levar em conta: a par das inoculações que determinam infecções intensas e mais ou menos facilmente evidenciaveis, ha as que são ligeiras e fugazes, sómente demonstraveis por buscas diretas reiteradas e prolongadas, e as « criptícas », que escapam

ainda a essas buscas, necessitando por seu turno a aplicação de processos indiretos de evidenciação.

A cultura *in vitro*, que até certo ponto pode ser comparavel ao xenodiagnostico (xenocultivo), é muito inferior a este, sobretudo pela facilidade de contaminação bacteriana dos meios, que impede muitas veses a observação dos resultados.

A cultura e a inoculação em animal são métodos que mais convêm dentro do laboratorio. O xenodiagnostico é o método mais pratico e mais conveniente ás investigações epidemiologicas extensas.

O xenodiagnostico é um processo natural de diagnostico. Com ele, procuramos repetir o que se passa na natureza, infectando os barbeiros na sua fonte habitual, que é o sangue dos vertebrados. Conforme já tivemos ocasião de dizer, o *indice de infestação dos reduvideos em determinado local representa como que o resultado de um « xenodiagnostico » natural* (Dias 1936, p. 91). A grande susceptibilidade dos barbeiros ao desenvolvimento do *S. cruzi* fez com que Brumpt os qualificasse de « merveilleux hôtes vecteurs ».

« Un tel résultat vient donc démontrer la réelle utilité de la méthode de diagnostic proposée par Brumpt, méthode dont l'emploi est indispensable dans des zones où l'on veut déterminer, par le diagnostic étiologique, la proportion de porteurs, humains ou animaux, du *Schizotrypanum cruzi* » — tal foi nossa conclusão (Dias, 1934 *b*) ao cabo dos primeiros ensaios que empreendemos em Lassance, que repetidas e variadas pesquisas ulteriores não fizeram senão confirmar.

SUMARIO

O xenodiagnostico é um processo muito valioso para o diagnostico etiologico da molestia de Chagas. Consiste em alimentar-se barbeiros normais em supótos portadores da infecção e determinar-se, depois, si eles adquirem ou não o parasitismo. Em cada região deve ser empregada, de preferencia, o transmissor local mais importante. Tres a seis ninfas famintas são geralmente empregadas em cada próva, devendo ficar em contacto com o doador até encherem-se completamente (15-30 minutos). Si o exame de fezes — espontaneamente eliminadas ou obtidas por punção anal — não revelar a presença de flagelados, os insétos devem ser dissecados 40 a 60 dias depois da sucção, para exame do conteúdo duodenal.

SUMMARY

Xenodiagnosis is a very valuable method for the etiological diagnosis of Chagas' disease. It consists in allowing the clean insect transmitter to feed upon the suspected carrier, and in ascertaining whether the bugs become infected. The principal local vector is the most suitable species to be used in a given region. Three to six hungry nymphs are usually employed in each test and must feed until repletion (15-30 minutes). If flagellates are not detected in the faeces or in the rectal contents, obtained by anal puncture, insects are dissected 40-60 days after the « infective meal » and the duodenal contents is examined.

BIBLIOGRAFIA

BRUMPT, E.

1914. Le xenodiagnostique. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la trypanosomose de Chagas. Bull. Soc. Pat. Ex., **7** : 706.

DIAS, E.

1934*a*. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, **28** (1) : 1-111.

1934*b*. Le xénodiagnostic appliqué à la trypanosomiase américaine. C. R. Soc. Biol., **118** : 287-289.

1936*a*. Xenodiagnostico e algumas verificações epidemiologicas na molestia de Chagas. IX Reunião Soc. Argentina Pat. Regional, **1** : 89-119.

1936*b*. Revisão geral dos hemoflagellados de Chirópteros. Idem, **1** : 10-88.

1938. Criação de Triatomideos no laboratorio. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, **33** (3) : 407-412.

1939. Chagas' disease: A comparative study of the susceptibility of four natural vectors to the experimental development of *Schizotrypanum cruzi*. Third International Congress for Microbiology, New York. Abstracts of communications : 164.

DIAS, E. & ROMANA, C.

1939. Algumas investigações sobre *Schizotrypanum* de Quirópteros. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, **34** (4) : 619-625.

Estampa 1

Fig. 1 — Aplicação de barbeiros em caso cronico de molestia de Chagas (Teodora Beatriz). Dispositivo improvisado.

Fig. 2 — Aplicação de barbeiros em cão, por meio de dispositivo improvisado.

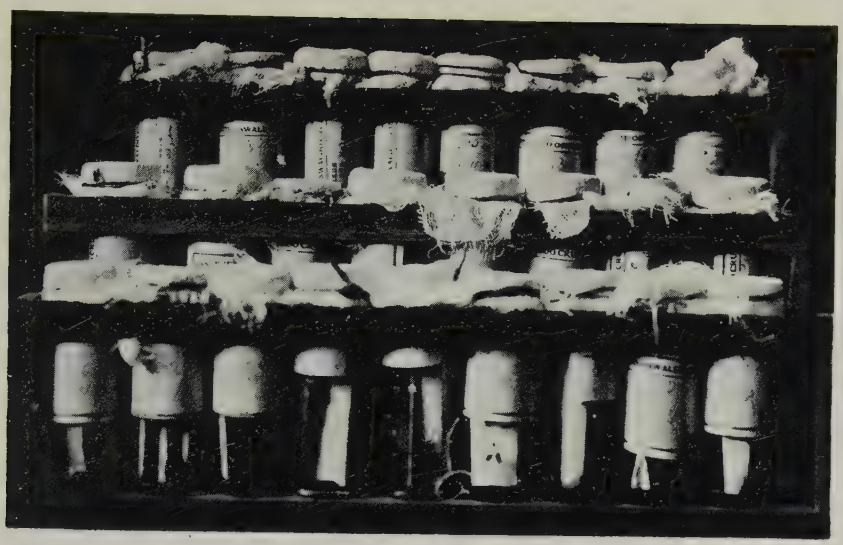
1

2

Dias: Xenodiagnostico na molestia de Chagas.

Estampa 2

Fig. 1 - Conservação dos insetos após a aplicação.
Fig. 2 - Pratica da punção anal em ninfa de *P. megistus*.
Fig. 3 - Preparação de tubo digestivo de *P. megistus*, distendido. Porção dilatada proxima á cabeça = estomago; porção tubular alongada = duodeno; porção ampular terminal = réto ou intestino posterior. Segundo Dias, 1934*a*.



1

2

3

Dias: Xenodiagnostico na molestia de Chagas.

Estudos sobre Triatomideos do Chile: Interessante caso de provavel polimorfismo *

por

Arthur Neiva e Herman Lent

(Com 6 figuras no texto)

Sob o nome de *Triatomaptera porteri* descrevemos recentemente (1) uma especie nova de triatomideo, para a qual criamos um novo genero baseado sobretudo no fáto de não possuir, praticamente, asas nos exemplares dos dois sexos. O material foi-nos enviado pelo Prof. Carlos E. Porter, de Santiago do Chile, e constava de 3 exemplares machos, duas femeas e uma ninfa.

Desde 1934, Porter (2) havia descrito do Chile, com o nome de *Triatoma spinolai*, uma especie da qual sómente em 1939 foi dada, pelo seu autor (3), uma fotografia pouco nitida. Tratava-se de especie baseada em exemplares machos alados, que possuia a particularidade de apresentar o conexivo uniformemente vermelho.

Desde 1936 vinhamos pedindo a Porter, diretamente por carta e, tambem, por intermedio de Flaminio Ruiz P., para que nos deixasse estudar o exemplar tipo da especie e desenha-lo para figurar na monografia sobre o assunto que temos em elaboração.

Não nos foi possivel obter o exemplar que o Prof. Porter possuia, até que, recentemente, recebemos o lote que acima assinalamos e que deu motivo á publicação que fizemos. Com a remessa deste material, que Porter, não muito categoricamente, identificava á sua especie *T. spinolai*, dizia-nos este pesquisador que, segundo Gajardo Tobar, as femeas de *T. spinolai* eram apteras, fáto que já havia sido acentuado em publicação feita por este autor (4) e em nota publicada por Porter (3).

Dizia-nos Porter em carta que acompanhava o material enviado, datada de Santiago do Chile em 16 de Janeiro deste ano, carta que, por engano, fôra enviada, com o material, ao Dr. John Lane, do Instituto de Higiene de S. Paulo, motivo pelo qual só nos chegou ás mãos nos ultimos dias do mês de Março, o seguinte:

* Recebido para publicação a 25 de Junho de 1940 e dado á publicidade em Agosto de 1940.

« Horriblemente ocupado con comisiones y exámenes, y debiendo apro-
« vechar época favorable para rapida excursion fuera de Santiago, habiendo
« logrado recibir *Triatomas* de la prov. de Coquimbo, se las remito a
« Ud. de acuerdo con su pedido, sin esperar recibir otras que me enviarán
« en mejor estado; hoy las he pedido para Ud.

« Ud. puede ver la fotografia del ejemplar que he reproducido el año
« 1938, p. 123. Le ruego devolverme esta foto tan pronto pueda.

« Aqui todos piensan que sólo hay dos *Triatoma*: la antiguamente
« conocida (Tr. infestans, Klug) y Tr. spinolai Porter (1933). Mi especie
« fue descripta, para no perder prioridad, sobre un ejemplar no en buen
« estado y en forma breve. Pero parece fuera de duda que al describirse
« una *Tr. Chilena* (cuya descripcion no me ha llegado) el descriptor
« no habrà visto la diagnosis de Tr. spinolai. No es dificil que Tr. spinolai
« Porter presente variaciones sobre todo en el conexivo. El Dr. Gajardo
« Tobar dice que las hembras carecen de alas. He escrito a este amigo
« que envie a Ud. material de Coquimbo. »

Já anteriormente, escrevia Porter em sua carta numero 501, de Dezembro de 1939:

« Recibi sua apble. de Nov. 20, 1939. Verè de enviar nuevamente
« *Helobdella* y encuanto reciba material fresco (vivos) de *Triatoma spi-*
nolai le enviarè con placer.

« .....

« Las hembras que despues se encontraron son ápteras en *Tr. spinolai*
« Porter y voy a dar una descripcion. »

Intercurrentemente (5), em Agosto de 1939, Usinger publicava a descrição de outra especie chilena de triatomideos, a *Triatoma chilena*, descrita como nova especie e sómente baseada, tambem, em 2 exemplares machos alados capturados na provincia de Coquimbo (Cruz Grande) em Novembro de 1916.

Ao lêr a descrição de *T. chilena* tivemos a impressão de se tratar de *T. spinolai*, afinidade esta que o proprio Usinger reconhece em seu artigo. Desde esta época se originou nossa insistencia junto a Porter para que obtivesse material de comparação. Interessados pelo assunto, entramos em contacto com Usinger que teve a gentileza de enviar a um de nós, Lent, um exemplar paratipo muito bem conservado, cujo desenho é aqui apresentado. Este exemplar vinha rotulado e determinado como *Stenotriatoma chilena* Usinger. Não conhecendo a publicação onde tivesse sido publicada a diagnose do novo genero que o rótulo indicava, escrevemos ao seu autor, em 4 de Abril, indagando do fáto. Este, em carta de 13 de Maio, nos informou que, apezar de ter tido a intenção de publicar um genero novo, até então ainda não o fizera.

Comparando o exemplar enviado por Usinger com a descrição de Porter não se dissiparam todas as nossas duvidas porque, as diferenças

registradas por aquele autor quanto ao colorido do conexivo persistiam, sem embargo do Prof. Porter, em sua carta de 16 de Janeiro, que acima transcrevemos, dizer que a diferença existente no conexivo não deveria passar de variação.

Firmado, assim, para nós, o conceito de *T. spinolai*, apezar de reconhecermos certa semelhança entre a cabeça desta especie e a dos exemplares que constituiam o material que recebemos de Porter, a ausencia de asas nos dois sexos impressionou-nos de tal modo que não hesitamos em publicar imediatamente, em nota prévia, um novo genero e uma nova especie.

Depois de ter sido divulgada a nota de 13 de Abril com a descrição de *Triatomaptera porteri*, recebemos, tendo sido acabado de imprimir em 20 de Março, em Buenos Aires, a publicação de Mazza, Gajardo & Jörg (6) sobre o assunto. Nesta publicação, estes autores criam o novo genero *Mepraia* para a especie *T. spinolai* Porter, que é claramente designada como genotipo, dando tão sómente como carater do genero, a ausencia de asas nos exemplares femeas desta especie. Isto porque, Mazza, Gajardo & Jörg tiveram em mãos exemplares machos alados que identificaram como *T. spinolai* e femeas apteras, que consideram tambem como pertencentes a esta especie, e que, muito bem estudadas, puderam ser identificadas por nós como iguais áquelas que possuimos e que, com machos tambem apteros, constituem o material sobre o qual nos baseamos para descrever *Triatomaptera porteri*.

Emquanto Mazza, Gajardo & Jörg, que não obtiveram exemplares machos sem asas, consideravam a questão como um caso interessante de dimorfismo sexual, nós que possuiamos machos e femeas apteros e nenhum exemplar alado, estavamos em face de uma adaptação extremamente restrita do inseto ao parasitismo e criamos uma nova especie que se diferenciava além do mais, de *T. spinolai*, por caracteres morfologicos no pronoto e no escutelo, que, pódem ser observados na descrição.

Estabelecia-se, assim, um nome generico que teria de entrar para a sinonimia, caso a especie *Triatoma spinolai* não venha, por outros caracteres, constituir um genero novo, como Usinger pretendeu formar quando rotulou um de seus exemplares como *Stenotriatoma*.

Si os fátos vierem demonstrar que essa especie deve pertencer a um genero novo, então prevalecerá a designação de *Mepraia, pro parte*, para a especie descrita em 1934 por Porter.

Apezar de na descrição os autores deste genero se referirem a femeas apteras, de que dão tambem fotografias, o nome *Mepraia* não poderá prevalecer para as femeas em questão porque elas não parecem ser representantes femeas de *T. spinolai*, considerado como genotipo, porém

pertencer, justamente, á especie que descrevemos com o nome de *Triatomaptera porteri.*

A' luz das Regras Internacionais de Nomenclatura Zoologica, o nome generico que deve prevalecer é o de *Triatomaptera*, ficando assim identificada a especie nossa e a que tempos atrás Porter descreveu:

a) *Triatoma spinolai* Porter, 1934.

Sin: *Triatoma chilena* Usinger, 1939

Mepraia spinolai Mazza, Gajardo & Jörg, 1940, *pro parte.*

b) *Triatomaptera porteri* Neiva & Lent, 1940.

Sin: *Mepraia spinolai* Mazza, Gajardo & Jörg, 1940, *pro parte.*

As duas especies são importantes além do mais porque, comprovadamente, constituem transmissores do *Schizotrypanum cruzi,* segundo verificações de Gajardo em proporção de 100 %.

* * *

Este era o conceito que haviamos formado até que o conhecimento de um trabalho de Jeannel (7), publicado em 1914, veiu colocar a questão sob um novo aspéto e torna-la até mais interessante, e, no momento, ainda não definitivamente resolvida.

Era nossa intenção demonstrar que o genero *Triatomaptera* devia prevalecer á denominação de *Mepraia* porque, de acôrdo com as Regras Internacionais de Nomenclatura Zoologica, o genero de Mazza, Gajardo & Jörg tinha sido estabelecido tomando *Triatoma spinolai* Porter como genotipo.

Embora a diagnose generica descrevesse as femeas como apteras e convencidos como estavamos que os machos tambem o eram, pois deles possuiamos 3 exemplares, iamos estabelecer a validez do genero *Triatomaptera*, descrito com a diferença de alguns dias, porque supunhamos haver no trabalho daqueles pesquisadores a confusão de duas especies, pois, embora tivessemos conhecimento da verificação de Gajardo de que as femeas do *T. spinolai* eram apteras, ao depararmos com exemplares machos, tambem apteros, formamos imediatamente um novo genero, baseado em uma nova especie.

Com a leitura do trabalho de Jeannel e dos comentarios mais amplos divulgados em outra publicação (8) deste autor, o assunto se complica porque, o referido investigador encontrou e descreveu um genero de reduvideo africano, ao qual denominou de *Paredocla,* que apresenta a singularidade de possuir machos concomitantemente apteros e alados,

sendo as femeas apteras. Neste genero só acontece tal fáto com uma unica especie — *P. Decorsei* Jeannel; os exemplares encontrados não foram, porém, obtidos de criação e sim colecionados pelo Dr. J. Decorse, na missão Chari-Tchad e estudados no Museu de Paris.

O assunto mostrava-se interessante e, pouco convencidos com a possibilidade de estarmos em presença de um caso identico ao de Jeannel, iniciamos o estudo da literatura que pudessemos encontrar sobre a materia, a começar, naturalmente, pelos manuais e tratados de entomologia.

Sabiamos da existencia, entre os hemipteros, de especies onde um dos sexos não possuia asas ou as apresentava atrofiadas, e a isso fizemos alusão na nota prévia:

> « As asas faltam nos dois sexos e esta é a primeira vez que isto « é referido nos insetos deste grupo, existindo sómente a verificação do « facto em varios grupos superiores de hemipteros, mas, sómente num « dos sexos. »

Ao proprio Jeannel, que admitia sem reservas a presença em certos hemipteros de um dimorfismo sexual muito pronunciado, pareceu extranho o que acontecia em *Paredocla Decorsei*, assim se referindo:

> « Mais l'apparition côte à côte, dans la même espèce, de mâles mo- « difiés dans le même sens que les femelles et de mâles non modifiés « est très remarquable, parce qu'elle ne pourrait guère s'expliquer que par « l'existence de générations alternatives ou par du mimétisme. »

Por outro lado, diz Jeannel ter constatado a hipertrofia do lóbo genital e do lóbo mediano do 6.º segmento ventral do abdomen nos machos teleomorficos (apteros) das especies de *Edocla* e *Paredocla*, o que não se verifica nos exemplares de triatomideos em questão.

Consultando os livros de Berlese (9), Comstock (10), Schroeder (11), Henneguy (12), Houlbert (13), Snodgrass (14), Silvestri (15) e Weber (16) nada vimos que pudesse resolver a questão. Sómente em Imms (17) encontramos o curto trecho que reproduzimos e por onde se vê como o fenomeno é pouco conhecido e merece ser estudado sob varios aspétos.

> « The little-understood phenomenon of alary polymorphism is pre- « valent in different families. That is to say, in the same species there « may be two or more forms of alary organs which, furthermore, may « be correlated with sex or may not. There are two well-marked types « of individuals, — the apterous and macropterous, sometimes with inter- « mediates or brachypterous forms.

« In certain African Reduviidae (*Edocla* Stal) the males are winged « and the females apterous and physogastric; in other species of the genus « both sexes are alike and physogastric. In *Paredocla* Jeann. there are « both winged and apterous males; the later resemble the females, which « are also apterous, and all forms are found together (Jeannel, *Voy. Afriq.* « *Orient.*, Hemiptera, 3, 1919).

« Many explanations have been advanced to account for alary poly- « morphism (vide Kirkaldy, 1906). It has been variously correlated with « climate, season, mimicry, capability for leaping or rapid locomotion, « and mode of life, whether arboreal or otherwise. Thus, in Africa, « Jeannel states that most of the apterous and brachypterous genera of « Reduviidae inhabit the hotter regions. In the European *Pyrrhocoris* « *apterus* both pairs of wings may be either normally developed, or « reduced to merely the horny basal portions of the hemelytra, and the « two forms vary very greatly both in local and seasonal occurrence. The « phenomenon offers a wide field for research, particularly from the genetic « point of view. »

E' necessario manter vivos, em criação, durante varias gerações, os insetos que apresentam tal polimorfismo, para verificar si as gerações alternantes surgem ou si os caracteres se repetem em cada sexo sem diferença.

No caso do *Triatoma spinolai* possuir, de fáto, femeas e machos apteros e ter, tambem, machos alados, então indubitavelmente, terá que prevalecer o genero *Mepraia* Mazza, Gajardo & Jörg. Si, entretanto, tal fáto não ocorrer, então julgamos que o genero *Triatomaptera* tem sua validez confirmada.

Um outro ponto poderá ajudar a elucidar a questão: é a procura intensiva de exemplares desta especie para encontrar femeas aladas, até agora não observadas. A ausencia deste sexo com asas fala a favor da hipotese de Jeannel, que, ao descrever sua *Paredocla Decorsei* acompanhando-a de desenhos e estampas, figura um dos exemplares machos (est. 7, fig. 25) com asas exuberantes ultrapassando o abdomen, um macho teleomorfico (est. 7, fig. 26) aptero e uma femea aptera (est. 7, fig. 27), estes ultimos apresentando alterações toracicas profundas em relação ao exemplar macho alado, tal como acontece nos exemplares de triatomideos chilenos.

Comtudo, o excelente trabalho de Jeannel, ao tratar das variações nesta especie mostra que a coloração das patas é variavel e que os aneis negros nelas existentes pódem ser de maior ou menor tamanho, existindo até exemplares cujos femures são todos amarelos com extremidades negras, quando os exemplares normais possuem 3 anulações negras nos femures e tibias. Estaremos, neste caso, na presença de uma unica especie?

De outro lado, como um dos capitulos do trabalho de Readio (18), publicado em 1927, com o titulo *Studies on the Biology of the Reduviidae of America North of Mexico*, encontramos uma documentação experimental que contraría o conceito de Jeannel.

Ao tratar do polimorfismo entre os reduvideos, Readio esclarece a existencia do fáto tambem em outras familias de hemipteros e, citando algumas especies onde o fenomeno é aparente, foi levado a criar exemplares de *Melanolestes picipes* (Herrich-Schaeffer), que é especie que possuia todos os machos com asas longas e as femeas macropteras ou braquipteras, com um resultado que poderá ser verificado melhor com a transcrição que fazemos:

« Very little has been done to clear up the questions which such a « condition suggests: « In how many cases is the short-winged or apterous « condition confined to one sex and in how many appearing in either « sex; just what effect environment has upon the development of wings; « whether the long- or short-winged condition is inherited; whether the « short-winged or apterous species are not, after all, distinct species in « some cases?

« The writer can make a start at settling the question in one species, « but has had no experience with the others. In *Melanolestes picipes*, « the males are all long-winged, and the females may be either long- or « short-winged. The species also presents color differences. The males « may or may not have the abdomen marked with red, particularly along « the connexiva; the short-winged females also may or may not show « the red color; the long-winged females do not ever show the color, « as far as the writer's observations go. The attempt was made to « rear the offspring of short-winged black, short-winged reddish, and long- « winged females to see if the characters of the parents were perpetuated « in the offspring. The first observation worthy of mention that was made « was that the first instar nymphs of the short-winged adults, both entirely « black and reddish, had a yellow prothorax, while those of the long-winged « forms had a black prothorax. There were found to be no variations « to this. Unfortunately only a very few adults resulted from the rearings, « seven from the short-winged forms, and three from the long-winged « forms. Of the seven reared from the short-winged forms three were « short-winged females and four long-winged males, all without traces « of red. Of the three reared from the long-winged females, one long- « winged female was obtained and two long-winged males, also without « any trace of red. The results of these rearings are too meager to be « of any practical value, but they indicate the possibility, at least, that « in this case the long- and short-winged females may represent two « distinct species, the males of which will have to be separated by some « other characters.

« In regard to the other species mentioned, the writer has no more « than a guess concerning the true condition of affairs. Careful rearings « would, however, settle these uncertain points. »

Aliás, esta especie tem uma historia muito curiosa, até certo ponto semelhante ao que agora está acontecendo.

Ao mesmo tempo (1848) em que Herrich-Schaeffer (19) descrevia *Pirates picipes*, publicava tambem outra especie proxima, *Pirates abdominalis*, depois transferidas para *Melanolestes*. Em 1872, Stal (20) considerava *abdominalis* como variedade de *M. picipes* adicionando á descrição original a informação de que na variedade as asas eram muito mais curtas.

Em 1876, Uhler (21) considera-as especies diferentes, o que tambem é aceito por Provancher (22), em 1887; Champion (23) em 1899; Fracker (24) em 1913; Torre-Bueno (25) em 1923 e Blatchley (26) em 1926; emquanto Parshley (27), em 1918, reconhece *abdominalis* como variedade de *picipes*.

Readio diz ter em sua coleção 5 formas diferentes: a) machos de asas longas inteiramente pretos; b) machos de asas longas com abdomen vermelho; c) femeas de asas longas inteiramente pretas; d) femeas de asas curtas inteiramente pretas; e) femeas de asas curtas com abdomen vermelho; e aponta os seguintes fátos:

1) que não existem machos de asas curtas;

2) que as femeas de tipos diferentes de asas pódem representar femeas de duas especies distintas, os machos das quais poderiam ser separados por outros caracteres;

3) que, com a criação em laboratorio, acredita que não se póde dar importancia ao colorido, que varia em certas circumstancias, porém o maior ou menor tamanho das asas nas femeas foi carater que se demonstrou constante.

Esta diversidade de opiniões se superpõe ao caso atual dos triatomideos em discussão. Sómente a comprovação de machos alados e apteros obtidos pela criação da especie apontada como *Mepraia spinolai* (Porter) e da que foi por nós descrita como *Triatomaptera porteri* poderá resolver definitivamente o assunto.

Com a finalidade de facilitar a compreensão da questão, vamos transcrever aqui a descrição original de Porter para *Triatoma spinolai*, a de Usinger para *Triatoma chilena* e a nossa sobre *Triatomaptera porteri*, além da redescrição do holotipo de *Triatoma spinolai*. A proposito de cada uma, comparando-as entre si, e confrontando-as com a publicação de Mazza, Gajardo & Jörg, teceremos amplos comentarios.

« *Triatoma Spinolai* Porter n. sp. »

« Largo: 20 mm.; ancho mayor del abdomen 6 mm. y del pronoto « cerca de 5 mm.

« Cuerpo angosto. Cabeza bastante prolongada por delante de los « ojos; antenas con pelos muy cortos en el 2.º artejo; los artejos 3.º y « 4.º claros y con pelos largos; el pico moreno con el último artejo ci- « liado. El pronoto finamente granuloso lleva adelante dos pequeñas « puntas y el lóbulo anterior dividido en dos por un surco mediano y « cada una de estas mitades con tres terminaciones a manera de escamas. « Las dos carenas longitudinales borradas antes del bordo posterior y « un poco divergentes.

« Los hemélitros sobrepasan la extremidad del abdomen y tienen « un tinte avellano claro. Los bordes del abdomen casi paralelos.

« Colores: Cabeza, antenas, pronoto y escutelo morenos. El abdo- « men tanta por encima como por debajo negro, salvo el conexivo que « es uniformemente rojo (*ruber* en la cromotaxía de Saccardo).

« Hab. — Cerca de Vicuña, Dr. A. Iturriaga, leg. ».

Esta descrição, que não póde ser datada do ano de 1933, porque a revista em que foi publicada é distribuida sempre no ano seguinte áquele ao qual se refere, foi divulgada, como nota prévia, para garantir prioridade e baseada em um exemplar macho, não em perfeito estado, como foi dito, ainda por seu autor, á pag. 122 da *Revista Chilena de Historia Natural*, año 42 (1938) publicada em 1939.

Não era possivel, portanto, a Porter referir-se ao dimorfismo sexual, como, em 1940, querem Mazza, Gajardo & Jörg. Tambem não podemos concordar quando estes ultimos autores dizem:

« Cuando examinamos um *Paratypus* proveniente de la colección de « Porter, pudimos advertir que a más de incompleta la descripción es « errónea, ya que los machos de la especie no poseen conexivo dorsal, « no pudiendo por lo tanto éste, ser uniformemente rojo, como dice el « autor.

« El conexivo ventral (sólo el del macho) muy estrecho, es efectiva- « mente uniformemente rojo, pero Porter no hace alusión a esta di- « ferencia de estructura. »

E isto fazemos porque recebemos de Porter, para ser incorporado á coleção do Instituto Oswaldo Cruz, o exemplar holotipo macho de *Triatoma spinolai*, o unico sobre o qual, repetimos, o conhecido naturalista chileno baseou sua diagnose. Neste exemplar, que redescrevemos a seguir com todos os pormenores que seu estado atual permite, pudemos observar que a descrição original de Porter, embora resumida, não é erronea. Existe conexivo dorsal e conexivo ventral neste exemplar,

muito estreitos aliás, como existe tambem no paratipo de *Triatoma chilena*, que examinamos. Em ambas as faces o conexivo, no exemplar holotipo de *T. spinolai*, é uniformemente vermelho, como Porter descreveu.

Porém, este colorido uniforme no conexivo ou a presença de manchas escuras sobre ele, dispostas de modo diverso, deve ser uma variação ampla, da qual pudemos surpreender os pontos extremos, emquanto Mazza, Gajardo & Jörg estudaram exemplares que apresentam um aspéto intermediario desta variação. Assim, o holotipo mostra conexivo uniformemente vermelho; o paratipo de *T. chilena* Usinger tem os seguintes caracteres no conexivo, tanto na face ventral quanto na dorsal: 1.º e 2.º segmentos vermelho, 3.º, 4.º, 5.º e 6.º com uma faixa preta transversal e mediana, o restante sendo vermelho; o 7.º segmento vermelho, porém um pouco escurecido no ponto correspondente ás manchas dos segmentos anteriores. Isto é, o primeiro exemplar sem manchas e o segundo com grande numero delas. As figuras 6 e 7 do trabalho de Mazza, Gajardo & Jörg esquematisam o conexivo em 2 machos alados, todos os dois com a face ventral do conexivo uniformemente vermelha e a face dorsal, num dos exemplares, vermelha nos segmentos 1.º e 2.º, com mancha escura pouco delimitada no 3.º segmento; e manchas nitidas nos 4.º e 5.º segmentos; os segmentos 6 e 7 são vermelhos; no 2.º exemplar o conexivo dorsal é vermelho, sómente com manchas pouco nitidas nos 3.º, 4.º e 5.º segmentos.

E', incontestavelmente, uma forma de transição e o maior argumento que possuimos para colocar *T. chilena* Usinger na sinonimia de *T. spinolai* Porter, já que outros caracteres não existem que permitam separar a especie do autor norte-americano da que Porter descreveu em 1934, conforme se poderá vêr pela descrição original que reproduzimos e pela figura total que publicamos de um paratipo cedido pelo autor (fig. 1).

« *Triatoma chilena* Usinger, n. sp.

« Elongate, sides subparallel, beset with extremely long erect bristles « on the body posteriorly beneath and on all parts of the appendages « except first antennal segment. Body surface finely granular-rugose and « polished.

« Head more than twice as long as broad, eyes included, subcylin- « drical; anteocular region four times as long as postocular region to « posterior constriction; tylus subbasally slightly enlarged; vertex trans- « versely coarsely rugose throughout its length at middle. Eyes, seen « from above, much broader than one-half width of interocular space. « Ocelli large and situated posterolaterally on oblique elevations. Antennae « inserted a little before middle of anteocular region; very long, their

« total length exceeding distance from apex of head to apex of clavus;
« first segment thickest, second more slender, third and fourth filiform

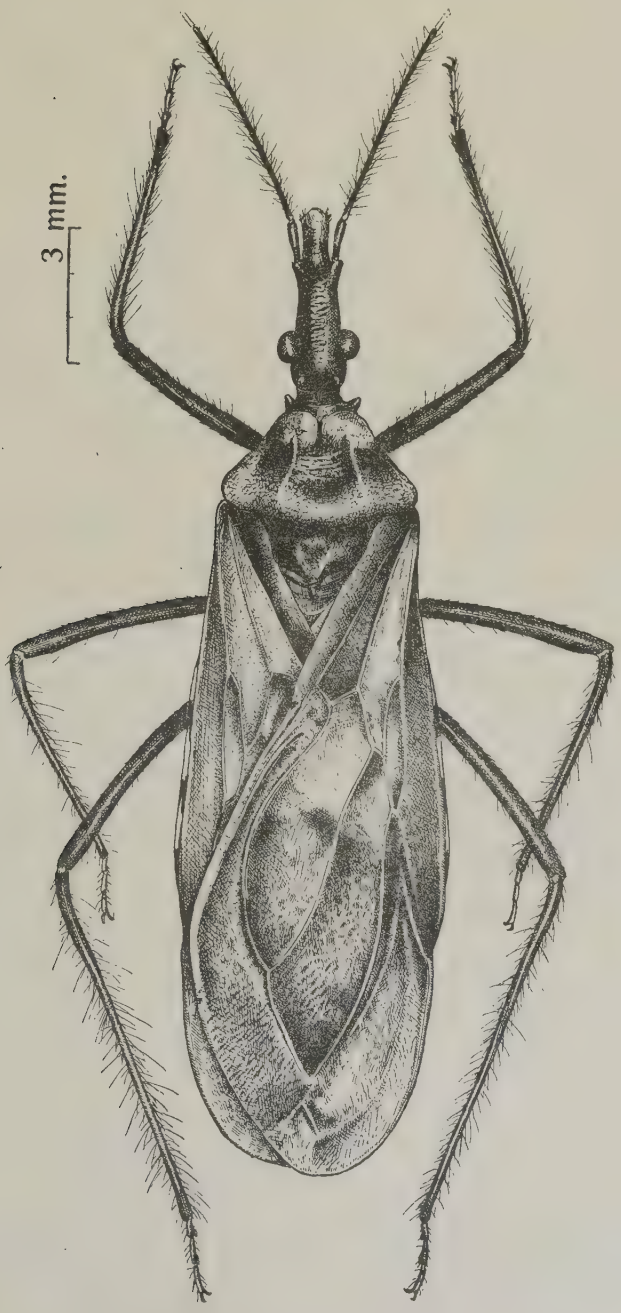


Fig. 1 — *Triatoma spinolai* Porter, 1934. Exemplar macho, paratipo de *Triatoma chilena* Usinger, 1939. R. Arlé *del.*

« and curved; first segment scarcely attaining apex of head, without hairs « or bristles; second segment more than four times as long as first, « densely beset with fine, erect, fulvous bristles about twice as long as « diameter of segment, and with numerous erect black bristles almost « five times as long as diameter of segment; vestiture of third and fourth « segments more or less as in second segment; the third segment less « than one-sixth shorter than second; and fourth one-half the length of « second. Rostrum reaching prosternum, the second segment about as « wide as slender front tibiae; first segment less than half as long as « second; third one-fourth as long as second; sparsely, irregularly pilose, « especially apically, and with a few long bristles at base. Pronotum « two-thirds as long as broad behind and one-third as broad anteriorly « as posteriorly; anterolateral angles produced laterally as bluntly pointed « tubercles; disk unarmed, strongly convex, all but obscuring the trans- « verse impression, which is represented merely by the feebly depressed « posterior margins of callosities; callosities with broad, minutely gra- « nular, vermiform areas; longitudinal carinae only feebly elevated above « the general convexity; disk sublaterally depressed, the humeral angles « rounded. Propleura produced ventrally just before front coxal cavities « and on either side of prosternal stridulatory groove as blunt, rounded « tubercles. Scutellum much broader than long, subtriangular, produced « posteriorly as a very short, subacute, upturned tubercle; disk roughened « but unarmed. Hemelytra very long, the membranes distinctly surpassing « tip of abdomen. Connexivum scarcely dilated, reflexed. Venter, in the « specimens before me, sublaterally depressed and appearing longitudinally « roundly keel-like at center; with long, suberect, backward-directed bristles « posteriorly. Legs very long and slender, bearing long black bristles; « the femora without short tubercles or spines beneath.

« Color brownish with a trace of piceous on the head and maculated « areas of ventral surface of abdomen. Elsewhere on venter dark brown « to ferruginous. Eyes silvery, ocelli white. Connexivum alternated with « reddish yellow about the sutures of segments. Tarsi, joints of appendages, « and sutures in general pale.

« Size. — Length 19 mm.; width (pronotum) 4 mm., (connexivum) « 5 mm.

« Holotype, male, Cruz Grande, Province of Coquimbo, Chile, No- « vember 9, 1916, T. Hallinan, accession number 5385, American Museum « of Natural History. Paratype, male, same locality as type, November 25, « 1916, in my collection.

« The paratype differs only in that the hemelytra are slightly longer, « the total length of the insect, in consequence, approaching 21 mm. »

Damos, a seguir, a redescrição do holotipo de *T. spinolai*, com o qual o paratipo de *T. chilena* concorda, á excepção dos detalhes já citados para o conexivo.

Triatoma spinolai Porter, 1934

Comprimento — Macho 22 mm.

Largura — Macho (ao nivel do pronoto) 5 mm.; (ao nivel do abdomen) 6,5 mm.

Inseto regularmente desenvolvido, de colorido geral pardacento, mais escuro na face inferior do abdomen, porém com o conexivo de colorido uniformemente vermelho. A distribuição de pêlos é irregular e escassa: existem regiões glabras, outras pouco pilosas providas de pêlos curtos e outras, como tibias, tarsos, rostro e face inferior do abdomen com pêlos longos e finos mais numerosos.

A especie é alongada, relativamente delgada, com pernas finas e compridas, principalmente as do 3.º par.

Cabeça de colorido castanho, que é mais claro nas faces laterais e inferior, delgada, alongada, com 4 mm. de comprimento, levemente mais comprida do que o pronoto, irregularmente rugosa e tuberosa, com cerdas pequenas e esparsas implantadas em pontuações e irregularmente dispostas. Região ante-ocular comprida, com cerca de 3 vêses o comprimento da região post-ocular, com *tylus* saliente e *jugae* em plano inferior e não atingindo o apice do *tylus*. Algumas cerdas finas e longas são visiveis na face inferior da cabeça, que é menos rugosa. Tuberculos para-frontais visiveis. Olhos salientes, lateralmente situados, mais aproximados entre si na face inferior, cada qual com a metade da largura da distancia interocular. Ocelos salientes, grandes, de colorido avermelhado, mais proximos entre si do que os olhos, afastados destes ultimos e implantados em saliencias no limite posterior da cabeça.

Tuberculos anteniferos implantados no meio da região ante-ocular, curtos e esparsamente pilosos, com um grupo de cerdas fortes e curtas situadas lateralmente no apice. Faltam as antenas no exemplar.

Rostro reto (fig. 4), delgado, longo e achatado dorso-ventralmente, de colorido castanho, revestido de pêlos longos e finos e outros curtos, os 2.º e 3.º segmentos mais pilosos do que o 1.º articulo que é forte e termina ao nivel da implantação do 1.º articulo antenal; 2.º articulo muito longo e mais delgado, medindo 3 vêses o comprimento do 1.º e terminando ao nivel do pescoço; 3.º articulo afilado, mais delgado, com 2/3 do comprimento do 1.º, repousando no sulco proesternal e atingindo a inserção do 1.º par de patas.

Pescoço castanho claro sem manchas.

Tórax de colorido castanho uniforme, sem manchas, com rarissimos pêlos esparsos, mais abundantes e longos sómente nos meso- e metaesterno, e com zonas rugosas, granulosas e glabras.

Pronoto bem constituido, grande, com 3,5 mm. de comprimento, de forma trapezoidal, dividido no terço anterior por um sulco transversal nitido nos 2 lóbulos habituais ao grupo. Lóbulo anterior ocupando o terço anterior do pronoto, dividido na linha mediana longitudinal por um sulco; existem zonas glabras e simetricas na linha mediana e lateralmente, a superficie do lóbulo é granulosa e apresenta dois tuberculos muito pequenos ao lado do sulco mediano longitudinal; o sulco que limita o colarinho é bem acentuado. Do limite dos 2 lóbulos, praticamente do lóbulo posterior, nascem as duas carenas longitudinais que são paralelas e se prolongam até a metade do lóbulo posterior. Lóbulo posterior tambem sem manchas, castanho, com a superficie enrugada e granulosa e as

partes mediana e laterais escavadas. Angulos anteriores do pronoto salientes, dirigidos para diante e para fóra, de ponta romba. Angulos posteriores obtusos.

Escutelo castanho, triangular, de tamanho normal, com o apice enrugado e de ponta romba não levantada. Nota-se uma escavação acentuada mediana e proximo ao apice; duas outras, uma de cada lado da linha mediana e proximo do bordo anterior do escutelo, menores; e uma depressão em cada bordo lateral.

Pro-, meso- e metapleuras granulosas e pregueadas irregularmente. Proesterno ocupado pelo sulco proesternal grande, possuindo, anteriormente, e de cada

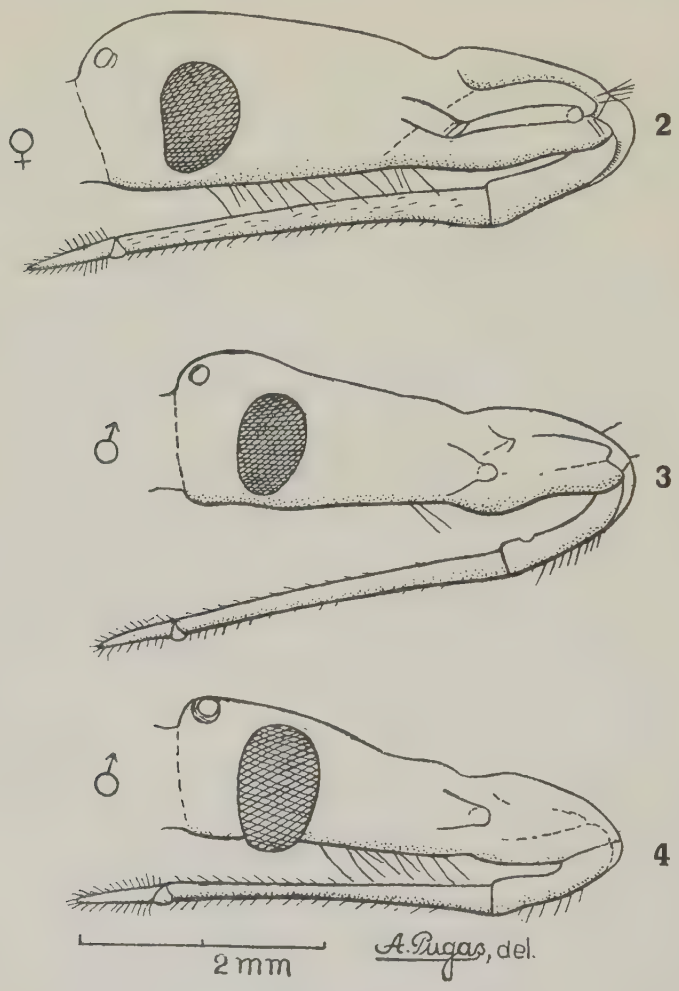


Fig. 2 — *Triatomaptera porteri* Neiva & Lent, 1940. Cabeça, de perfil, desenhada do alotipo femea. Fig. 3 — *Triatomaptera porteri* Neiva & Lent, 1940. Cabeça, de perfil, desenhada do holotipo macho. Fig. 4 — *Triatoma spinolai* Porter, 1934. Cabeça, de perfil, desenhada do holotipo macho.

lado, uma grande protuberancia. Mesoesterno mais liso, ainda granuloso, com pêlos finos e longos, com uma crista transversal adiante da implantação do 2.º par de patas e onde se inicia uma crista longitudinal que percorre o metaesterno,

Patas delgadas, uniformemente castanhas, longas e revestidas de pêlos finos e longos, mais abundantes nas tibias e nos tarsos. Femures sem espinhos. Tibias com a metade do diametro dos femures e mais longas do que eles nos 2.º e 3.º pares, com fosseta esponjosa no apice nos 1.º e 2.º pares. Tarsos pardacentos, triarticulados, muito pilosos. Unhas fortes.

Asas bem constituidas, ultrapassando o abdomen, com membrana clara e nervulação como na fig. 5.

Abdomen com pilosidade longa e fina na face inferior e estigmas salientes e amarelados junto ao bordo do conexivo e no meio de cada segmento.

O conexivo é uniformemente vermelho [1], quer no dorso, quer na face ventral; é delgado, muito estreito, porém nitido em ambas as faces. O colorido vermelho avança, tambem, em faixa sobre as faces dorsal e ventral do abdomen e, nesta, vai um pouco além do limite dos estigmas. Cada segmento ventral do abdomen possue duas placas estigmaticas glabras em fileira longitudinal.

A genitalia é bem constituida e possue pilosidade abundante, externamente.

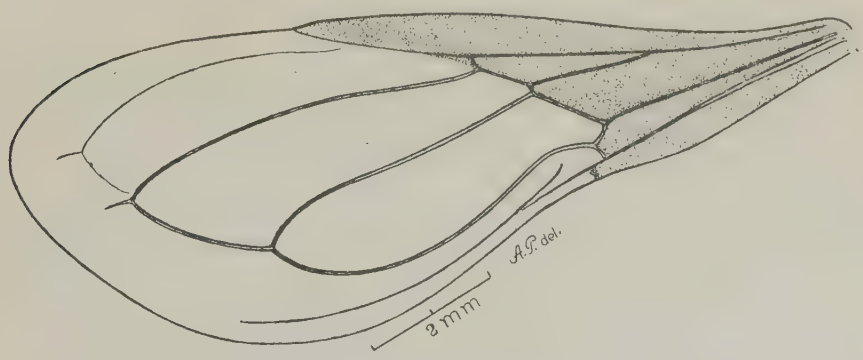


Fig. 5 — *Triatoma spinolai* Porter, 1934. Hemelitro, desenhado do holotipo.

Finalmente, reproduzimos a descrição de *Triatomaptera porteri* Neiva & Lent, 1940, especie baseada em machos e femeas apteros e cujas femeas concordam com os exemplares do mesmo sexo descritos por Mazza, Gajardo & Jörg como *Mepraia spinolai* (Porter).

---

[1] No exemplar paratipo de *Triatoma chilena*, o conexivo possue as seguintes caracteristicas : 1º. e 2º segmentos vermelho ; 3º, 4º, 5º, e 6º com uma faixa preta transversal e mediana o restante sendo vermelho ; o 7º segmento é vermelho porém um pouco escurecido no ponto correspondente ás manchas dos segmentos anteriores.

Este exemplar mede 21 mm. de comprimento total e largura de 4,5 mm. (ao nivel do pronoto) ou 6 mm. (ao nivel do abdomen). Possuia 4 rotulos : 1) T. Hallinan, Cruz Grande, Coquimbo, Chili Nov. 25-16 ; 2) Ac. 5385 ; 3) Paratype Stenotriatoma chilena Usinger ; 4) Stenotriatoma chilena Usinger, Det. by R. L. Usinger.

Damos, tambem, uma figura total do macho sem asas (fig. 6) e desenhos da cabeça do macho e da femea, de perfil (figs. 2 e 3), mostrando nitidamente, em comparação com a fig. 4, que é de *Triatoma spinolai*, diferenças quanto á colocação e tamanho dos olhos e ocelos.

« **Triatomaptera porteri** Neiva & Lent, 1940

« Comprimento — Machos 18 a 19 mm.; femeas 20 a 20,5 mm.

« Largura (ao nivel do pronoto) — Machos e femeas 3 mm.; (ao « nivel do abdomen), machos 5 a 6 mm., femeas 7 mm.

« Inseto de tamanho médio, uniformemente escuro, preto no abdo- « men e castanho escuro nas outras partes do corpo, porém com o cone- « xivo irregularmente manchado de vermelho. A distribuição de pêlos é « irregular: existem regiões glabras, outras pouco pilosas e algumas, como « tibias, tarsos, femures, face inferior do abdomen e rostro, abundante- « mente providos de pêlos longos e finos.

« A especie é alongada, relativamente delgada, com pernas finas e « compridas, principalmente as do 3.º par, e logo se caracterisa pela au- « sencia de azas nos exemplares adultos.

« Cabeça de colorido castanho escuro na face superior, colorido que « é mais claro sobretudo na face inferior da região post-ocular, delgada, « alongada, com quasi o dobro do comprimento do pronoto, irregular- « mente rugosa e tuberosa, com cerdas pequenas e esparsas implantadas « em pontuações e irregularmente dispostas. Região ante-ocular comprida, « com cerca de 3,5 vezes o comprimento da região post-ocular, com « *tylus* saliente possuindo algumas cerdas alongadas em sua parte anterior « e *jugae* em plano mais inferior. Cerdas mais alongadas e finas são tam- « bem visiveis na face inferior da cabeça ao lado do rostro quando em « posição de repouso e, tambem, no apice das genas. Tuberculos para- « frontaes visiveis, com o mesmo colorido castanho escuro. Olhos sa- « lientes lateralmente situados, cada qual com a metade da largura da « distancia inter-ocular (nas femeas a distancia inter-ocular é maior, equi- « vale a 3 vêses a largura de cada olho, como, tambem, toda a largura « da cabeça é maior do que nos machos). Ocelos salientes, brilhantes, « mais proximos entre si, afastados dos olhos e implantados em saliencias « bem no limite posterior da região post-ocular, de colorido avermelhado.

« Tuberculos anteniferos implantados no meio da região ante-ocular, « curtos e quasi sem revestimento piloso, com um grupo de cerdas fortes « e curtas situadas apical e lateralmente. 1.º articulo antenal quasi atin- « gindo o apice da cabeça, mais dilatado na extremidade apical, de colo- « rido castanho escuro e raros pêlos esparsos; 2.º articulo longo, com « cerca de 4 vêses o comprimento do 1.º e diametro menor, revestido de « pêlos muito curtos e finos e outros mais longos e delgados esparsa- « mente dispostos. Faltam os articulos 3.º e 4.º.

« Rostro réto, delgado, longo e achatado dorso-ventralmente, de colo- « rido castanho escuro, revestido de pêlos curtos e outros mais longos e « finos no apice do 3.º segmento e ao lado da cavidade onde repousa o

« labro no 1.º segmento. 1.º articulo do rostro forte, terminando ao nivel « da implantação do 1.º articulo antenal no tuberculo antenifero quando « o rostro está em posição de repouso; 2.º articulo muito longo e mais « delgado, terminando ao nivel do pescoço, medindo mais de 3 vêses o « comprimento do 1.º articulo; 3.º articulo afilado, mais delgado, com 2/3 « do comprimento do 1.º, repousando no sulco pro-esternal e atingindo « a inserção do 1.º par de patas.

« Pescoço castanho claro sem manchas.

« Tórax de colorido castanho escuro uniforme, com rarissimos pêlos « esparsos e zonas rugosas, granulosas ou glabras.

« Pronoto forte, bem constituido, de forma quadrangular dividido ao « meio por um sulco transversal nos dois lóbulos comuns a todas as es- « pecies da familia.

« Lóbulo anterior grande, tão comprido ou um pouco mais comprido « do que o lóbulo posterior, dividido na linha mediana por um sulco « longitudinal profundo, com zonas glabras simetricas na linha mediana « e lateralmente; a superficie restante do lóbulo é granulosa, ainda exis- « tindo, de cada lado da linha mediana e proximo ao sulco que limita « o colarinho, um tuberculo pouco saliente de apice obtuso. Do terço « posterior do lóbulo anterior nascem as carenas longitudinais que se « prolongam até a metade do lóbulo posterior e são quasi paralelas. « Lóbulo posterior tambem sem manchas, de coloração castanho escura, « com a superficie enrugada e granulosa e as partes mediana e laterais « escavadas. Angulos anteriores do pronoto salientes, dirigidos para diante « e um pouco para fóra, de ponta romba. Angulos posteriores obtusos.

« Escutelo castanho escuro, pequeno, mais largo do que comprido, « implantado sobre uma placa de contorno semi-circular, com um sulco « mediano longitudinal e profundo e o apice pouco acentuado e rombudo; « de cada lado do sulco e convergindo para o apice o escutelo é constituido « por uma elevação que, com a do lado oposto, dá ao conjunto uma forma « de « V ».

« Pro-, meso- e metapleuras castanho escuras, granulosas e pregueа- « das irregularmente. Pro-esterno quasi todo ocupado pelo sulco pro- « esternal que, anteriormente e de cada lado, possue uma grande protu- « berancia; fóra do sulco veem-se alguns pêlos finos. Meso-esterno gra- « nuloso e rugoso, provido de pêlos finos e longos, na metade posterior « do qual se inicia uma crista mediana que se prolonga até o fim do « meta-esterno, que tambem é granuloso e possue os finos pêlos assigna- « lados.

« Patas uniformemente coloridas, castanho escuras, longas, revestidas « de pêlos finos e longos, mais abundantes nas tibias e nos tarsos. As « patas dos 1.º e 2.º pares são praticamente iguais em tamanho, emquanto « as do 3.º par são sensivelmente maiores. Femures sem espinhos, só- « mente com uma pequena saliencia apical inferior. Tibias com a metade « do diametro dos femures e fosseta esponjosa bem visivel nos 1.º e 2.º « pares. Tarsos pardacentos triarticulados, com pilosidade mais abun- « dante do que nos demais segmentos das patas, e com duas unhas fortes.

« Asas atrofiadas, praticamente inexistentes; observa-se uma placa, co- « riacea em toda a extensão, implantada de cada lado do escutelo e com

« o mesmo comprimento que ele, onde é visivel a sutura do clavo e uma « ou outra nervura, em alguns exemplares.

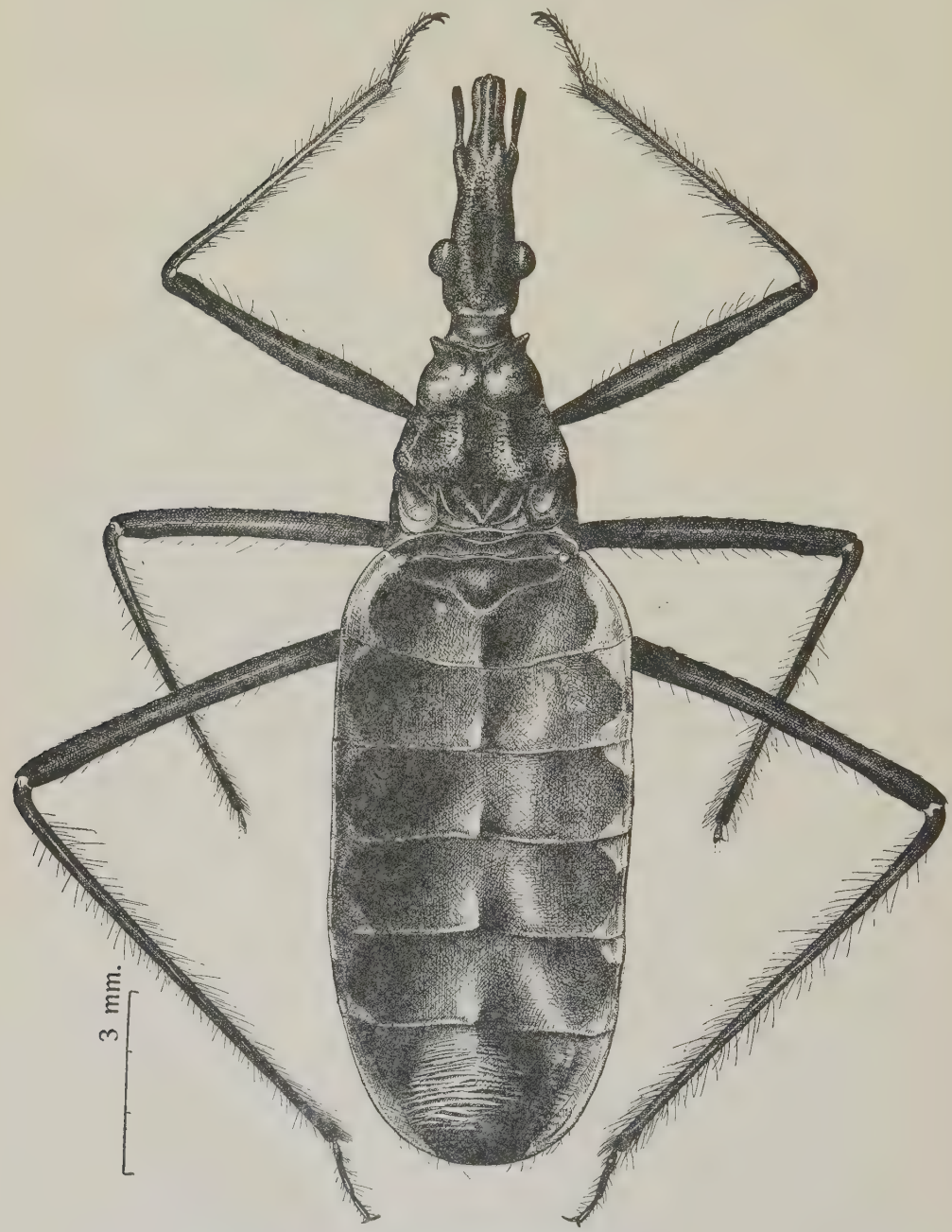


Fig. 6 — *Triatomaptera porteri* Neiva & Lent, 1940. Exemplar holotipo macho. R. Arlé *del.*

« Abdomen arqueado, todo descoberto na face dorsal, com 7 segmentos « aparentes dorsalmente (o primeiro segmento, que não é visivel nas es- « pecies aladas, é bem nitido), preto, sómente com um leve tom aver- « melhado ao nivel da porção mediana do 2.º segmento abdominal, pre- « gueado transversalmente, com raros pêlos esparsos e uma saliencia me- « diana em cada segmento junto á linha que os separa. O segmento « genital é constituido pelos 8.º, 9.º e 10.º segmentos abdominais. Ven- « tralmente, o abdomen possue pilosidade maior e mais numerosa. Es- « tigmas salientes, arredondados, amarelados, ao nivel da metade de cada « segmento e junto ao conexivo. Conexivo possue caracteristicas proprias « que podem ser assim descritas, quando observado dorsalmente: machos « e femeas 1.º e 2.º segmentos todo vermelho; 3.º, 4.º, 5.º e 6.º segmentos « vermelho com uma faixa preta transversal e mediana; 7.º segmento todo « vermelho nos machos e com a faixa preta identica nas femeas; ventral- « mente o aspéto é semelhante, o contorno vermelho avançando um pouco « mais sobre o abdomen. O conexivo é constituido nas femeas por duas « folhas juxtapostas, apresentando-se, por isso, com duas margens.

« Genitalia, em ambos os sexos, de colorido castanho escuro. »

Proveniencia — Provincia de Coquimbo, Chile. Gajardo Tobar coll., Porter leg., I/1940.

Holotipo macho; alotipo femea; paratipos dois machos, uma femea. Todos na coleção do Instituto Oswaldo Cruz.

A especie é dedicada ao Prof. Carlos E. Porter, que, com tanta competencia e tenacidade, tem trabalhado no Chile para o maior desenvolvimento das ciencias naturais.

Reiterando nossos agradecimentos ao Prof. Porter pela solicitude com que nos atendeu, enviando-nos material e informações, tornamos extensivos á Prof. Heloisa Alberto Torres, diretora do Museu Nacional do Rio de Janeiro, pelas facilidades que nos proporcionou permitindo que R. Arlé executasse os desenhos totais que ilustram o presente trabalho.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1) Neiva, A. & Lent, H.

1940. Sobre um novo triatomideo chileno: *Triatomaptera porteri*. (Nota prévia). Brasil-Medico, **54** (15) : 265-267; 13 de Abril.

2) Porter, E. C.

1934. Una Triatoma nueva chilena. Rev. Chil. Hist. Nat., **37** : 192-193 (1933).

3) Porter, E. C.

1939. Notas de Parasitologia. Rev. Chil. Hist. Nat., **42** : 122-124, lám. 8 (1938).

4) Gajardo Tobar, R.

1939. El *Schizotrypanum cruzi* y sus agentes vectores en Chile. Rev. Chil. Hist. Nat., **42** : 132-137, lám. 9 (1938).

5) Usinger, R. L.

1939. Descriptions of new *Triatominae* with a key to genera (Hemiptera, Reduviidae). Univ. Calif. Publ. Ent., **7** (3) : 33-56, 1 pl.

6) Mazza, S., Gajardo Tobar, R. & Jörg, M. E.

1940. Investigaciones sobre Triatomidae. *Mepraia* novum genus de Triatomidae. *Mepraia spinolai* (Porter) 1933, nov. comb., redescripción de macho y descripción de hembra. Mis. Est. Pat. Reg. Argent., Jujuy, Publ. 44, 30 pp., 27 figs.

7) Jeannel, R.

1914. Tableaux des Acanthaspidiens d'Afrique du groupe des *Edocla* Stal (Hem. Reduviidae) (note préliminaire). Bull. Soc. Ent. France, séance du 25 mars, pp. 174-177.

8) Jeannel, R.

1919. *Henicocephalidae* et *Reduviidae, in* Voyage de Ch. Alluaud et R. Jeannel en Afrique orientale (1911-1912). Résultats scientifiques, III, pp. 131-314, 30 figs. texte, pls. 5-12. Paris (cf. pp. 136-138, 197-212).

9) Berlese, A.

1909-1925. Gli insetti, loro organizzazione, svillupo, abitudini e rapporti coll'uomo. 2 vols. Milano.

10) Comstock, J. H.

1936. An Introduction to Entomology. 8th. ed. XIX + 1044 pp., 1228 figs., N. York.

11) Schroeder, C. von

1912-1930. Handbuch der Entomologie. 3 vols. Jena.

12) Henneguy, L.

1904. Les insectes. Morphologie, reproduction, embryogenie. Paris.

13) Houlbert, C.

1920. Les insectes. Anatomie et physiologie générales. Introduction à l'étude de l'entomologie biologique, 2e. édit., 374 pp., 207 figs. — Paris.

14) Snodgrass, R. E.

1935. Principles of Insect Morphology. IX + 667 pp., 319 figs. — New York.

15) Silvestri, F.

1934. Compendio di Entomologia applicata (Agraria, Forestale, Medica, Veterinaria), **1** : 448 pp., 414 figs. Portici.

16) Weber, H.

1930. Biologie der Hemipteren. VII + 543 pp., 329 figs. Berlin.

17) Imms, A. D.

1938. A General Textbook of Entomology. 4th. ed., XII + 727 pp., 624 figs., New York (cf. pp. 352-353).

18) Readio, P. A.

1927. Studies on the Biology of the Reduviidae of America North of Mexico. Univ. Kansas Sci. Bull., **17** (1) : 5-291, pls. 1-21.

19) Herrich-Schaeffer, G. A. W.

1848. Die Wanzen-artigen Insecten, vol. 8.

20) Stal, C.

1872. Enumeratio Hemipterorum, **2**, Svenska Vet.-Ak. Handl., **10** (4) : 1-159.

21) Uhler, P. R.

1876. List of Hemiptera of the region west of the Mississippi river, including those collected during the Hayden explorations of 1873. Bull. U. S. Geol. Geog. Surv. Terr., **1** : 269-361.

22) Provancher, A. L.

1887. Petite faune entomologique du Canada, **3**. Les Hémiptères, 354 pp., 5 pls., Quebec.

23) Champion, G. C.

1899. Biologia Centrali-Americana. Hemipt.-Heteropt., **2**, XVI + 416 pp., 22 pls. London.

24) Fracker, S. B.

1913. A systematic outline of the Reduviidae of North America. Proc. Iowa Acad. Sci., **19** : 217-252.

25) Torre Bueno, J. R. de la

1923. Reduviidae. *In* Britton, Hemiptera of Connecticut. Conn. Geol. Nat. Hist. Surv., **34** : 674-692.

26) Blatchley, W. S.

1926. Heteroptera or true bugs of Eastern North America, 1116 pp., 215 figs., 12 pls., Indianopolis.

27) Parshley, H. M.

1918. Hemipterological notes. Psyche, **25** : 64-65.

Comentario ao esquema de classificação das Salmonellas de Kauffmann-White *

por

Genesio Pacheco e Gobert Araujo Costa

Analogias encontradas entre certas bacterias intestinais permitiram reunil-as sob a denominação de « *grupo coli-tifico* ». Posteriormente destacaram-se em genero separado os bacilos *coli*, ficando o bacilo tifico agregado somente aos paratifos que com ele apresentavam mais estreitas afinidades, sob a denominação grupo « *tifico-paratifico* ». Por fim adotou-se a designação « grupo » ou « genero » *Salmonella*. Desde inicio estabeleceram-se diferenças entre os representantes deste grupo, baseadas em provas culturais e sôrologicas. A par de caracteres morfologicos e tintoriais, ficou assentado que os paratifos ou salmonelas seriam bacterias não dotadas de capacidade fermentadora da lactose e da sacarose, não liquefazendo gelatina, não dando indol nem acetoína e dotadas de ação patogenica para homem ou para animal. A analise antigenica das salmonelas começou com Schütze que estabeleceu relações sôrologicas entre elas. Smith & Reagh já haviam mostrado a existencia de dois componentes antigenicos nas bacterias deste grupo, distinguindo na *Salmonella suipestifer* um componente somatico, presente nas formas moveis e imoveis desta bacteria, e um componente ciliar, existente unicamente nas formas moveis. Diferenças identicas foram verificadas mais tarde por Weil & Felix nos *proteus*, onde tambem encontraram um componente somatico e um componente ciliar, tendo creado então as expressões O e H para esses dois tipos do antigeno. Posteriormente foram eles encontrados nas Salmonellas e em grande numero de outras bacterias. Finalmente Andrews, numa analise sôrologica detalhada do antigeno ciliar, consegue distinguir dois estádios a que denominou *fase*: alguns elementos da cultura possuem antigenos ciliares comuns a mais de um tipo de paratipo, outros somente se relacionavam sôrologicamente com seu proprio antigeno. Denominou Andrews ao primeiro « fase inespecifica » e ao segundo « fase especifica ».

Bruce-White reuniu certo numero de paratifos em um conjunto em que a analise antigenica entrava por muito. Kauffmann extendeu as

* Recebido para publicação a 24 de Maio de 1940 e dado á publicidade em Agosto de 1940.

verificações de Andrewes e de Bruce-White, esmiuçando exhaustivamente a analise da constituição antigenica dessas bacterias, sob a designação de grupo *Salmonella*, adotando a designação proposta por Ligniéres em 1900 e já admitida pela Comissão Americana de Bacteriologistas, conseguindo organisar um esquema, modificado do esquema proposto por Bruce White anteriormente, o qual logrou ser aprovado pela « Sub-Comissão do grupo Salmonella » da Liga das Nações, em 1934.

Nesse esquema adota Kauffmann uma numeração arbitraria para designar os antigenos somatico e ciliar, este com as duas variantes descritas por Andrewes. Compunha-se o esquema de Kauffmann, adotado pelo « Sub Committee », de 10 antigenos somaticos ou antigenos O, designados pelos algarismos romanos I-X; de 25 antigenos ciliares ou antigenos H especificos, designados pelas letras a-z; de 6 antigenos H inespecificos de grupo, expressos pelos numeros 1-6.

Inicialmente ainda atribuia Kauffmann certo valor ás provas culturais, em concorrencia com as provas sôrologicas, na especificação das salmonellas. Com o correr do tempo foi relegando aquelas provas a segundo plano, com tendencia a abandonal-as por completo nos ultimos trabalhos, para ater-se exclusivamente na analise sôrologica como base univoca para determinação de uma amostra de salmonella.

Seria seu esquema realmente um progresso consideravel na sistematica das salmonellas pela precisão e pela simplificação decorrentes desse criterio na sistematisação, si não viesse ele apresentar, como veio, dificuldades ainda maiores que anteriormente, quando as determinações incluiam as provas culturais e não esmiuçavam tanto a analise antigenica.

Com efeito, o método sôrologico de determinação de Kauffmann exige um trabalho prévio de preparo de consideravel numero de sôros, possuintes de anticorpos O e H, este com anticorpos especificos e inespecificos. Essa dificuldade não é pequena porque obriga o trato com animais, preparo de antigenos, inoculações repetidas, sangrias, determinação de potencia dos sôros, distribuição e conservação dos sôros especificantes. Nada menos de 11 sôros seriam necessarios, e para perfeição das provas devem-se preparar antigenos crús e cosidos, ensaiar numerosas colonias isoladas, crescidas em placas de agar mole, postas em contato com sôros especificos sobre laminas e em tubos, e ainda levar a efeito provas de saturação de Castellani.

Em verdade nem sempre todos os sôros são necessarios para especificar determinada especie de salmonella, mas ha que possuil-os todos quem quizer se colocar em condições de identificar qualquer amostra de salmonella porventura isolada.

A analise dos constituintes antigenicos joga, pois, com fatores, que

numa série de combinações permitiria um numero quasi incomensuravel de tipos: o esquema admitido pela « Salmonella Subcommittee » era constituido por 44 tipos, distribuidos em 5 grupos. A especificação dos tipos depende de combinações entre os antigenos somaticos e flagelares. E' assim que o 1.º grupo A, tem como antigeno basico o antigeno somatico I, não possuindo fase inespecifica, sendo, portanto, monofasico.

Os tipos de salmonellas deste grupo são em numero de 3; a *S. senftenberg* e a *S. senftenberg* var. *newcastle*, possuindo antigenos comuns, podiam ser distinguidas pelos caracteres culturais. Seguindo o criterio estabelecido por Kauffmann, é possivel admitir a existencia de outras especies dentro deste grupo. Aplicando a fórmula das combinações

$$C_m^p = \frac{m\,(m-1)\,(m-2)\ldots(m-p+1)}{1.2.3.\ldots.p.}$$

aos antigenos conhecidos, podemos admitir a existencia, não comprovada, de 24 especies sôrologicas diferentes, contando somente com os fatores antigenicos somaticos até então encontrados no grupo A, isto é, I, II, III, e com os antigenos flagelares especificos *a*, *g*, *s*, não se conhecendo antigenos flagelares inespecificos neste grupo. Poderiamos estabelecer um esquema teorico assim:

Antigeno O	Antigeno H	
Grupo A	Especifico	Inespecifico
I	—	—
I, II	—	—
I, III	—	—
I	a	—
I	g	—
I	s	—
I	ag	—
I	as	—
I	ags	—
I	gs	—
I, II	a	—
I, II	g	—
I, II	s	—
I, II	ag	—
I, II	as	—
I, II	ags	—
I, II	gs	—
I, III	a	—
I, III	g	—
I, III	s	—
I, III	ag	—
I, III	as	—
I, III	ags	—
I, III	gs	—

Imaginemos agora a possibilidade de existencia em combinações dos varios antigenos *O* de I a X, 2 a 2, contando sempre o I como basico de grupo: teriamos um total de 10 combinações diferentes. Poderiamos, pois, contar 10 especies ou tipos de salmonelas do grupo A, somente com o antigeno O, sem entrar com antigenos H. Combinando-se estes 10 antigenos *O* com os 25 *H* especificos, um a um, teriamos 250 combinações diferentes ou especies novas. Admitindo a possibilidade de apparecimento de fases especificas duplas (2 antigenos especificos p. ex. — as, ag, etc.) teriamos então, pelo calculo das combinações, com os 25 antigenos especificos, combinados 2 a 2, 3.000 novos tipos. Somando-se 10 tipos O a 250 e 3.000, teriamos no grupo A um total de 3.260 especies ou tipos, distintos sempre sôrologicamente, no caso da verificação da existencia de numero suficiente de antigenos. Isto, no caso deste grupo não apresentar ou possuir fase inespecifica, entrando os antigenos especificos e somaticos conhecidos apenas 2 a 2. Se imaginarmos combinações de antigenos 3 a 3, esse numero cresceria assustadoramente, limitando, é claro, essas considerações apenas em torno do grupo A, onde o numero de componentes antigenicos é pequeno em relação aos outros grupos.

Após os estudos realisados pelo « Sub-Committee of Salmonella Group » novos fatores antigenicos foram introduzidos na constituição flagelar. A fase especifica foi dividida em fase alpha e beta, o que veio trazer maior complexidade á estrutura antigenica das salmonelas e possibilidades de aumento consideravel de combinações antigenicas. E' de se notar tambem a verificação de novos antigenos *O*, que de 10 passaram a 29, de antigenos *H* não especificos que de 6 passaram a 7, de *H* especificos que são atualmente 39. E não pararíamos ahi, pois os fatos demonstram que todos os dias novas amostras aparecem, insuficientemente aglutinadas pelos sôros conhecidos, tornando necessaria a criação de outros elementos antigenicos, somaticos ou flagelares.

Analisando o esquema das salmonellas publicado no « Manual of Determinative Bacteriology » de Bergey (1939), em comparação com aquele estabelecido pelo Sub Committee de Salmonellas, vemos quanto aumentou aquela complexidade antigenica com admissão de novos tipos.

Encarando o grupo *C* ainda pelo esquema primitivo, e aplicando o raciocinio acima, do grupo A, chegamos a uma monstruosidade numerica de poderem existir neste grupo 244.118 tipos de salmonelas sôrologicamente diferentes. Isto sem incluir no calculo os novos elementos antigenicos discriminados nos esquemas recentes.

Com um numero tão grande chegariamos a ter mais tipos de salmonellas que de especies bacterianas sistematisadas no Manual de Bergey.

Realmente, tem-se verificado cada ano um crescimento consideravel de especies novas de salmonellas descritas, de modo tal que seu numero será talvez capaz de egualar ou sobrepujar as especies bacterianas bem conhecidas e admitidas até aqui, justificando a hipotese comentada atrás.

Compreende-se que o numero de especies bacterianas seja infinito e que as salmonellas devem acompanhal-as nessa infinidade. Na natureza todos os dias devem-se formar tipos novos, mormente entre os seres inferiores que entre os mais elevados na escala fitologica, estes menos adstritos ao ambiente, ás condições nutritivas, ao clima, ás estações e outros fatores influentes na formação de variantes ou tipos. E a analise sôrologica de Kauffmann, mais que qualquer outra, demonstrou exuberantemente a existencia dessa infinidade de especies ou tipos bacterianos.

Mas sua analise foi aperfeiçoada em demasia para a pratica bacteriologica. Mostrou, sem duvida, quão complexa é a organisação das bacterias, mas exigiu um excesso de detalhe para a sua determinação especifica.

A analise sôrologica exclusiva para a especificação bacteriana pode apresentar causas de erro ou dificuldades na sua execução. Mesmo com as salmonellas pode-se ter em mãos, por exemplo, o *Chromobacterium typhi flavum* (*B. typhi flavum*) Dresel & Stickel, uma bacteria da natureza, encontradiça nas aguas, no sólo e nas poeiras do ar, podendo penetrar no intestino e chegar até as vias urinarias, cuja aglutinabilidade com sôros paratifos é conhecida e gerou a hipotese de se tratar de uma variante da *Salmonella tiphosa*. Poderia-se argumentar que essas bacterias, porque não são todas identicas, representam os tipos ancestrais do bacilo tifico. Neste caminho não conseguiriamos separar as especies parasitas das especies da natureza e a bacteriologia cairia num cáos do qual todos se esforçam para fugir, desde Pasteur. Realmente, deve haver um criterio, ou mais de um, para separar especies bacterianas parasitas das especies de vida livre, porque aquelas interessam mais de perto o antropocentrismo. E tanto assim é que as relações sôrologicas quasi sô têm sido estudadas e aplicadas ás bacterias parasitas do homem pelo seu contato obrigatorio com os humores e as consequencias disso decorrentes, primeiro começados a verificar por Durham e Gruber no sôro de cobaias inoculadas com bacilo tifico.

Habs & Arjona encontram na urina e fezes de uma insana um coli apresentando relações sôrologicas com as salmonellas, possuindo antigeno O do tipo IX do esquema de Kauffmann-White, o que mostra a existencia de dificuldades para especificar certas amostras com o criterio sôrologico exclusivo.

Relações antigenicas dessa ordem têm sido assinaladas tambem com

outras bacterias, e o criterio determinativo de Kauffmann faria periclitar a identificação de amostras bacterianas si fosse generalisado; e nós sabemos a influencia que exercem sobre os espiritos os novos caminhos . . .

Os prejuizos neste caso não seriam grandes si se limitassem á parte academica da sistematica, mas nele se incluem possibilidades de erros diagnosticos, de consequencias muitas vêses imprevisiveis.

Não queremos desmerecer o esforço de Kauffmann e dos que o precederam, numa analise percuciante desse interessante grupo bacteriano em que se demonstrou a complexidade antigenica das bacterias; apenas achamos que a organisação de um esquema de tão elevada complexidade, exigente de elementos tecnicos tão numerosos, não comporta uma aplicação pratica na determinação de qualquer amostra de salmonela, senão em um serviço organisado como o de Kauffmann. Demais, um esquema permitindo a existencia de tantas especies foge, a bem dizer, das realidades da vida, por se tornar dificilmente praticavel.

Nós já estudamos de uma feita cerca de 600 amostras de coli em mais de 20 de suas propriedades bioquimicas e não conseguimos classificar então 10% das amostras pela chave de classificação desse grupo bacteriano existente no Manual de Bergey. Si quizessemos crear uma chave de classificação com os elementos de determinação então empregados certamente teriamos conseguido classifical-os todos mas cairiamos no mesmo exagero facultado pelo esquema de Kauffmann.

E' evidente que o criterio de Kauffmann é unilateral ou exclusivista, e a nós parece que o exclusivismo não se adapta á sistematica biologica. Todo sistema de classificação biologica baseado num só carater ou elemento não tem subsistido. Pensamos que com o de Kauffmann poderá suceder o mesmo.

O assunto deve ser reconsiderado, readmitindo as provas culturais como necessarias á determinação, e estudando outras que possam separar amostras, incluindo-se nelas, é claro, provas sôrologicas. Os caracteres culturais por si só não satisfazem á sistematica das salmonellas. Basta referir que alguns dos caracteres genericos desse grupo, como a não produção de indol, comporta exceção como a *S. holsatiensis* de Roelke e a *S. eastbourne* de Kauffmann, que são indologenas; a ausencia de ataque á lactose encontra exceção na variedade lacto-fermentadora de *S. anatum* de Kauffmann.

Já se rebelaram contra o método de Kauffmann Hohn & Hermann, e Jansen em 1937, clama contra o numero excessivo de especies decorrentes de sua aplicação que já atingia em 1934 a 60, no periodo de 3 anos de sua aplicação á sistematica das salmonellas. Salienta Jansen, além disso, o fato de se reunirem com ele especies distintas pelas propriedades

bioquimicas e pela infectibilidade ou origem parasitaria, e separar outras que deviam estar reunidas, contra a orientação seguida por Hohn & Hermann. O numero de salmonellas atualmente admitido pelo esquema de Kauffmann atinge a 68, segundo Bergey, e tudo indica que crescerá enormemente, justificando a suposição deduzida acima pelo calculo das combinações. Si o numero de fatores antigenicos permanecer tal qual estabeleceu Kauffmann e os que lhe seguiram as pegadas, o numero de especies ou tipos poderá crescer, a bem dizer, indefinidamente. Os 10 antigenos O do esquema original de Kauffmann passaram para 29, nos H especificos acresceram-se outros tantos pelas fases alpha e beta e aos H inespecificos adicionou-se mais um. Além disso foram encontrados outros antigenos ou componentes antigenicos — Antigeno Vi de Felix & Pitt, antigenos W, V e W-V de Kauffmann, que poderão concorrer na analise antigenica.

O conhecimento dos elementos complexos de um sistema é indice de aperfeiçoamento mas deixa de o ser quando dificulta ou impede sua aplicação, parcialmente que seja. Exigir um conjunto de elementos dificeis de obter para determinar uma bacteria é o mesmo que dificultar ou impedir sua realisação.

Pelas dificuldades na sua aplicação o esquema de Kauffmann não se generalisou nem mesmo na Alemanha, onde foi organisado e publicado, e é referido com restrições nas recentes edições dos tratados de Bacteriologia.

ABSTRACT

The classification of salmonellae in accordance with the Kauffmann-White schema accepted by the « Salmonella Sub-Committee » presents various inconveniences and difficulties to application. Among these is the necessity of preparing, dosing and preserving a considerable number of specific sera whose validity as is well known, is limited.

The criterion of Kauffmann's classification is exclusively, for it abandoned cultural tests, leaving therefore only a unilateral criterion. By following it one might include *Chromobacterium typhi-flavum in the Salmonella* genus as well as other bacteria which differ completely from the Salmonella, as long as they are antigenically related.

On the other hand, the chart approximates or separates in the diferent groups of antigen O species or types of salmonellae which are biologically close or almost indistinguishable.

The chart has given rise to an excessive number of species and types of salmonellae which from 44 in the chart approved by the « Sal-

monella Sub-Committee » in 1934 rose to 60 in Bergey's Manual and everything leads one to believe that the end is not yet for every day new types or species are found. And perforce this must be so for new antigenic factors have been found which give rise to new structural combinations.

Applying the formula of combinations

$$C_{m}^{p} = \frac{m\,(m\text{-}1)\,(m\text{-}2)\ldots(m\text{-}p+1)}{1.2.3.\ldots p.}$$

to the factors already known, there are probable possibilities of having 269 different antigenic combinations in group A, or 3260 types or species if all the flagellate antigens of the other groups should be found, in it combined 2 and 2. Further applying the formula of combinations to the other groups there would be possibility of so many combinations that the number of salmonellae would exceed the number of known bacterian species or perhaps the number of those existing on earth.

Undoubtedly Kauffmann-White's chart is an improvement, but the bacterian analysis made with it was exaggerated and exceeded the limit of the present possibilities of the realities of life. It revealed interesting aspects of the somatic complexity of bacteria but seems untenable because of its use in pratical sense.

LITERATURA CONSULTADA

Andrews, F. W.

1922. J. Path. Bact., **25** : 505.
1925. Ibd., **28** : 345.

Bruce-White

1927. Syst. of Bact., **4** : 86.

Cristensen, A.

1937. Zeit. für Hyg., **120**.

Cruichshank, J. C.

1935. The Journ. of Hyg., **35** : 354.

Dresel und Stickel

1928. Deutsche med. Woch., **54** : 517.
1930. Arch. f. Hyg., **104** : 330.

Dresel, V. Gara and Stickel

1930. C. f. Bact., **119** : 268.

Gruber, M. & Durham, H. E.

1896. Münch. Med. Woch., **43** : 285.

Habs, H. und Arjona, E.

1934-35. Zentralbl. für Bakt., **133** : 204.

Hohn & Hermann

1935. Cent. f. Bakt., **133** : 183.

Jansen, J.

1937. Zeit. für Infket. der Haust., **25** : 11.

Kauffmann, F.

1937. Zeit. für Hyg., **120** : 176.
1928. Zeit. für Hyg., **108** : 411.
1937. Zeit. für Hyg., **119** : 352.
1934. Zeit. für Hyg., **116** : 368.
1936. Zeit. für Hyg., **118** : 540.
1934. Zeit. für Hyg., **116** : 368.
1935. Zeit. für Hyg., **117** : 431.
1931. Zeit. für Hyg., **25** : 273.
1930. Zeit. für Hyg., **111** : 221, 233, 247.
1937. Zeit. für Hyg., **119** : 356.
1936. Zeit. für Hyg., **119** : 101.
1935. Zeit. für Hyg., **116** : 671.
1936. Zeit. für Hyg., **117** : 778.
1936. Zeit. für Hyg., **118** : 318.
1935. Zeit. für Hyg., **116** : 617.
1929. Zeit. für Hyg., **109** : 47.
1929. Zeit. für Hyg., **110** : 161.
1929. Zeit. für Hyg., **110** : 526.
1929. Zeit. für Hyg., **110** : 537.
1930. Cent. für Bakt., **119** : 152.
1934. Erg. der. Hyg., **15** : 219.

Kauffmann, F. & Mitsui, C.

1930. Zeit. für Hyg., **111** : 221.
1930. Zeit. für Hyg., **111** : 233.
1930. Zeit. für Hyg., **111** : 740.
1930. Zeit. für Hyg., **111** : 749.

Kauffmann, F. & Möller, E.

1940. The Journ. of Hyg., **40** : 246.
1934. The Salmonella Subcommittee of the Nomenclature Committee of Int Soc. of Microbiology. Journ. of Hyg., **34** : 333.

Schutze, H.

1920. Lancet : 93.

Scott, W. M.

1926. Journ. of Hyg., **25** : 398.

Smith, T. & Reagh, A. L.

1903. J. Med. Research, **10** : 89.

v. Gara and Stickel

1930. Centralbl. f. Bakt., **117** : 18.

Weil, E. & Felix, A.

1920. Zeit. f. Immunitf. I, **29** : 24.

Contribuição ao conhecimento dos crustaceos do Rio de Janeiro *

Catalogo dos Crustaceos da Baía de Guanabara

(*Continúação*)

por

Lejeune P. H. de Oliveira

CLASSE **CRUSTACEA**

Sub-classe **MALACOSTRACA**

Divisão *Peracarida*

Ordem *AMPHIPODA* Latreille, 1816

Sub-ordem **Gammaridea** Dana, 1852

Familia **LYSIANASSIDAE** (Dana, 1856)

121 — *Lysianassa nasuta* Dana, 1853, U. S. Explor. Expedit., vol. 13, II, p. 915.

SINONIMIA

Lysianax nasuta Della Valle, 1893, F. Fl. Neapel, vol. 20, p. 793.

Lysianassa nasuta Stebbing, 1906, Tierreich, vol. 21, p. 40.

122 — *Lysianassa brasiliensis* Dana, 1852, P. Amer. Acad., vol. 2, p. 208.

SINONIMIA

L. brasiliensis Dana, 1853, U. S. Exp. Exp., vol. 13, II, p. 914.

L. brasiliensis Stebbing, 1906, Tierreich, vol. 21, p. 87.

Familia **GAMMARIDAE** Leach, 1813

123 — *Elasmopus brasiliensis* (Dana) 1853, U. S. Expl. Exp., vol. 13, II, 956.

---

* Recebido para publicação a 27 de Maio de 1940 e dado á publicidade em Agosto de 1940.

Sinonimia

Gammarus brasiliensis Dana, 1853.

G. brasiliensis Stebbing, 1888, R. V. Challenger, vol. 29, p. 267.

G. brasiliensis Della Valle, 1893, F. Fl. Neapel, vol. 20, p. 737.

Moera brasiliensis Kossmann, 1880, Reise Roth. Meer., vol. 21, p. 132.

Gammarella brasiliensis -|-

-|- *Moera pectenicrus* Bate, 1862, Cat. Amphip. Brit. Mus., p. 180.

Elasmopus brasiliensis Stebbing, 1906, p. 443.

Familia **TALITRIDAE** Stebbing, 1906

124 — *Orchestoidea brasiliensis* (Dana) Bate.

Sinonimia

Orchestia brasiliensis Dana, 1853, U. S. E. Exp., vol. 13, II, p. 857.

Orchestoidea brasiliensis Bate, 1862, C. A. Brit. Mus., p. 13.

O. brasiliensis Stebbing, 1906, Tierreich, vol. 21, p. 529.

125 — *Hyale graminea* (Dana).

Sinonimia

Allorchestes graminea Dana, 1852, P. Amer. Acad., vol. 2, p. 208.

A. gramineus Bate, 1862, Cat. Amph. Brit. Mus., p. 46.

Hyale graminea Stebbing, 1906, vol. 21, p. 564.

126 — *Hyale media* (Dana).

Sinonimia

Allorchestes media Dana, 1853, U. S. E. Exp., vol. 13, II, p. 898.

A. medius Bate, 1862, C. A. Brit. Mus., p. 46.

Hyale media Wrzesniowski, 1879, Zool. Anz., vol. 2, p. 200.

H. pontica Della Valle, 1893, F. F. Neapel, vol. 20, p. 524.

H. media Stebbing, 1906, Tierreich, vol. 21, p. 569.

Familia **PHOTIDAE** Boeck, 1872 & 1876

127 — *Microprotopus hirsuticornis* (Dana).

SINONIMIA

Gammarus hirsuticornis Dana, 1852, P. Amer. Acad., vol. 2, p. 210.

Dercothoe hirsuticornis Dana, 1853, U. S. E. Exp., vol. 13, II, p. 972.

D. hirsuticornis Bate, 1862, Cat. Amp. Brit. Mus., p. 260.

Protomedeis maculata Della Valle, 1893, F. F. Neapel, vol. 20, p. 436.

Familia **AMPITHOIDAE** Stebbing, 1899

128 — *Ampithoe brasiliensis* Dana, 1853, U. S. E. Exp., vol. 13, II, p. 943.

129 — *A. filicornis* Dana, 1853, p. 944.

Familia **JASSIDAE** Stebbing, 1906

130 — *Jassa pulchella* Leach, 1814, Edinb. Enciclop., vol. 7, p. 433.

SINONIMIA

J. pulchella Stebbing, 1906, Tierreich, vol. 21, p. 654.

Familia **COROPHIIDAE** Dana, 1849

131 — *Ericthonius brasiliensis* Dana, 1853, U. S. E. Exp., vol. 13, II, p. 976.

SINONIMIA

Cerapus brasiliensis Bate, 1862, C. A. Brit. Mus., p. 263.

Ericthonius brasiliensis Stebbing, 1906, Tierreich, vol. 21, p. 671.

132 — *Corophium quadriceps* Dana, 1852, P. Amer. Acad., vol. 2, p. 219.

SINONIMIA

C. quadriceps Della Valle, 1893, F. F. Neapel, vol. 20, p. 374.

Familia **PODOCERIDAE** Stebbing, 1906

133 — *Podocerus brasiliensis* (Dana).

SINONIMIA

Platophium brasiliensis Dana, 1853, U. S. E. Exp., p. 838.

Platophium brasiliensis Stebbing, 1888, Rep. Voy, Challenger, vol. 29, p. 265.

Podocerus brasiliensis Stebbing, 1899, Ann. nat. Hist., ser. 7, vol. 3, p. 239.

(Continúa)

Sobre uma nova especie de crustaceo Chthamalus rhizophorae n. sp. *

(Chthamalidae: Cirripedia)

por

Lejeune P. H. de Oliveira

(Com 1 estampa)

Colhemos na Ilha da Sapucaia, Baía do Rio de Janeiro, presas no tronco de um « mangue », arbusto da especie *Rhizophora mangle* L., oito exemplares de uma « caraca » do genero *Chthamalus* de um tamanho relativamente muito grande, dos quais quatro individuos mediam 18 a 21 mms. de diametro basal; não havia nenhum outro cirripede junto a este. Pela bibliografia vimos que as « caracas » deste genero são pequenas, de 5 até 10 mms. de diametro basal, quasi nunca excedendo 12 mms.; faz exceção o *C. Hembeli*, que vive nas Ilhas Hawai, cujos individuos velhos medem 75 mms. de diametro. Como não nos foi possivel sua identificação a nenhuma especie descrita, denominamo-lo de *C. rhizophorae*, sendo suficiente para ser distinguido os dados desta nota prévia; a descrição detalhada deverá aparecer nas Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.

Chthamalus rhizophorae n. sp.

Genero *Chthamalus* Ranzani, 1817, Opusculi Scientifici, vol. 1, p. 276.

Descrição:

« Caracas » de testâ cônico deprimido, côr cinza ou branca suja, medindo 18 a 21 mms. de diametros carino-rostral e lateral, altura de 5 mms. Orificio losangular, sendo mais largo para o lado carinal que para o lado rostral, comprimento: 8 mms.

* Recebido para publicação a 19 de Junho de 1940 e dado á publicidade em Agosto de 1940.

A largura deste orificio está para o comprimento como a relação 2/3. Carina alta. As partes de seu testâ são facilmente destacaveis umas das outras. Superficie interna lisa.

Compartimento rostro-lateral do lado direito quasi da mesma largura que o do lado esquerdo, o mesmo acontecendo para o compartimento carino-lateral direito e esquerdo. A carina tem duas *alae* e o rostro tambem tem duas *alae* de ambos os lados; eles quasi são da mesma forma, apenas diferindo em tamanho. Compartimentos rostro-laterais com radios de ambos os lados, os radios são estreitos. Compartimento lateral com ala no lado rostral e radio no lado carinal; estes radios são estreitos.

O contorno externo do escuto é em forma de um triangulo com dois lados iguais (5-5-7 mms.), pois as suas margens medem: a ocludente — 7,2 mms., a basal — 5 mms., e a tergal — 4,6 mms.

Margem ocludente quasi reta.

Margem basal ligeiramente convexa.

Tergo com apice não em forma de ponta.

Base membranosa.

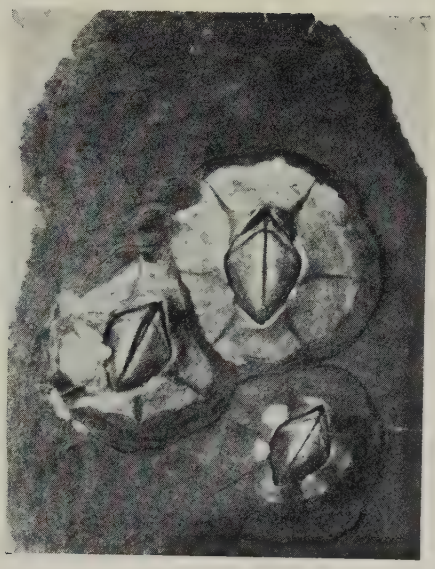
Tipos: — No Instituto Oswaldo Cruz, conservados em alcool.

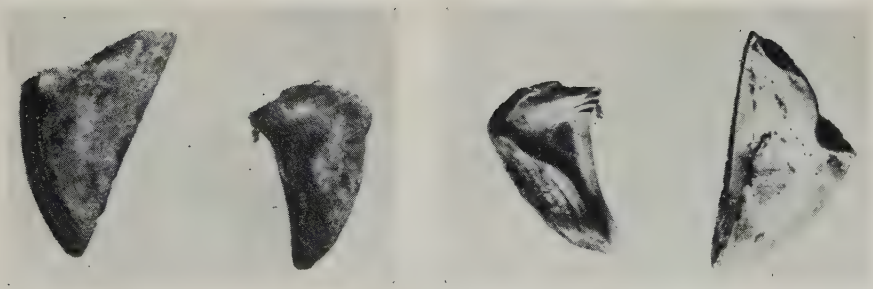
Estampa 1

Chthamalus rhizophorae n. sp.

Tres individuos sobre *Rhizophora mangle* L.; aumentado 1 1/2. Foto de M. Pinto.

Tergo e escuto, vista interna e externa; aumentado 4 1/2. Foto de M. Pinto.





Oliveira: *Chthamalus rhizophorae* n. sp.

A capacidade sulfidrigena [1] (produção de H^2S) é uma propriedade geral das bacterias heterotroficas *

por

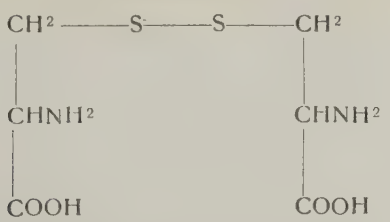
Genesio Pacheco e Gobert Araujo Costa

Constantemente existe o enxofre na materia proteica utilisada pelas bacterias em seu metabolismo. Mais vêses existe o enxofre na molecula resultante da digestão das proteinas, depois de reduzidas a acidos aminados, termo final dos processos digestivos para a assimilação. Dos aminos-acidos, elementos caracterisados pela substituição do H do grupo mais proximo do COOH por uma amina NH^2, muitos deles possuem S na sua molécula:

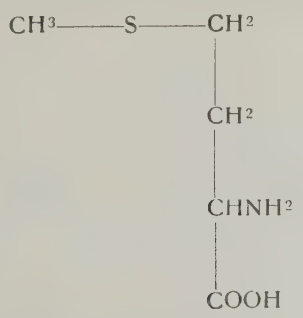
O acido β - tio - α - aminopropionico ou *cisteína*

$CH^2SH.\ CHNH^2.\ COOH$

O acido bi - tio - α - aminopropionico ou *cistina*



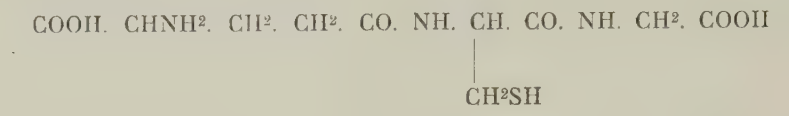
O acido - γ - metiltiol - n - butirico ou *metionina*



[1] Achamos mais acertada a expressão sulfidrigena que sulfurigena, anteriormente usada, para a produção de H^2S pelas bacterias.

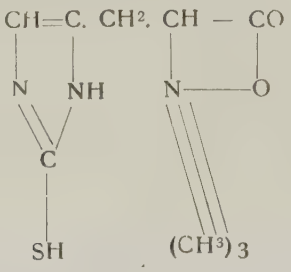
* Recebido para publicação a 1 de Abril de 1940 e dado á publicidade em Setembro de 1940.

O acido gama-glutamil-cisteimilglicinico ou *glutathion*, tripeptide contendo cisteína:



Além dessas, outras substancias frequentes nas proteinas usadas nos meios de cultura possuem enxofre:

A betaína da tiolhistidina



A ergotionina, varios acidos cisteinicos, e muitos outros.

O teôr em S das proteinas é variavel. A cistina, por exemplo, entra em porcentagem de 0.04 gr. no gluten, 7.5 gr. na queratina, 0.3 gr. na hemoglobina, 0.07 gr. na caseina, substancias frequentemente utilisadas na preparação de meios de cultura para bacterias. A metionina entra em 0.2-2 gr. % na caseina e se encontra tambem na ovalbumina, na gelatina e na queratina. A ergotionina existe nas hematias.

Além destas, a taurina, taurocolatos, tiuréa, são compostos sulfurados importantes no metabolismo e não raro existentes nos meios de cultura.

O acido amino-etilsulfonico, $CH^2NH^2CH^2SO^3H$, em conjugação com o acido colico, forma acidos biliares da taurina. Por outro lado, a taurina pode derivar da cisteína, num processo de descarboxilação e oxidação do grupo sulfidrilico, por processo obscuro, resultando num composto mais estavel que parece um sistema de reserva do enxofre para o organismo, uma vês que a administração de taurina não aumenta o acido taurocolico eliminado (Pride).

A função respiratoria ou a oxidação intima das celulas está bem vista intimamente ligada ao grupo sulfidrilico desse composto, demonstrado na conhecida reação de Arnold com o nitroprussiato de sodio.

Não é indiferente ás bacterias a presença do enxofre na molecula proteica, ou mesmo em natureza. Relacionadas ao metabolismo bacteriano do enxofre, distinguem-se no grupo das bacterias autotroficas, isto é, bacterias capazes de sintetisar as substancias necessarias á sua nutrição, a familia *Thiorodaceae* de Van Niel. O ion S dos compostos sulfurados funciona no processo fotosintetico destas bacterias.

A utilisação do enxofre pelas bacterias autotroficas se faz por oxidação completa, quando se trata do enxofre, incompleta quando se trata de compostos sulfurados. Stephenson distingue 6 grupos de bacterias autotroficas de acordo com a atividade metabolica do enxofre e seus compostos:

1) Organismos que oxidam H^2S fazendo depositar S sob fórma de granulações intracelulares.

$$H^2S + 1/2\,O^2 \longrightarrow H^2O + S$$

Exemplos — *Thiotrix* e *Beggiatoa.*

2) Organismos sulfoxidantes com deposição de S em granulos extracelulares.

$$5Na^2S^2O^3 + H^2O + 4O^2 \longrightarrow 5Na^2SO^4 + H^2SO^4 + 4S$$

Exemplo — *Thiobacillus.*

3) Organismos sulfoxidantes ás custas dos nitratos.

$$6KNO^3 + 5S + 2CaCO^3 \longrightarrow 3K^2SO^4 + 2CaSO^4 + 2CO^2 + 3N^2$$

Exemplo — *Thiobacillus denitrificans.*

4) Organismos acido-resistentes, oxidando enxofre diretamente a sulfatos.

$$S + 1\ 1/2\,O^2 + H^2O \longrightarrow H^2SO^4 \text{ ou}$$

$$Na^2S^2O^3 + 2O^2 + H^2O \longrightarrow NaSO^4 + H^2SO^4$$

Exemplo — *Thiobacillus thioxydans.*

5) Organismos acido-tolerantes oxidando tiosulfatos a sulfatos.

$$Na^2S^2O^3 + H^2O + 2O^2 \longrightarrow Na^2SO^4 + H^2SO^4$$

Exemplos — *Thiobacillus thioxydans, T. novellus.*

6) Intermediarios, vivendo heterotroficamente.

$$2Na^2S^2O^3 + H^2O + 1/2\,O^2 \longrightarrow Na^2S^4O^6 + 2NaOH$$

Exemplo — *Pseudomonas.*

O metabolismo do enxofre pode representar papel na atividade vital propriamente das bacterias, ou servir como ativador de fermentos, como na proteinase (Stephenson). Resulta da decomposição dos acidos aminados sulfurados, l-cistina e l-cisteína, H^2S e CH^3SH (hidrogenio sulfurado e metilmercaptana), estes na dependencia de teôr em hidrocarbonado do meio de cultura, segundo Kondo.

Nestes processos de transformação bioquimica, decorrentes de oxidação em geral, com produção de calorias, resultam manifestações de energia pelos microorganismos.

Em presença da luz, natural ou artificial, faz-se a assimilação do CO^2 por estas bacterias por meio da redução fotosintetica dos compostos sulfurados oxidaveis.

O ataque á molecula aminada dos compostos sulfurados — cistina, cisteína e metionina, já foi observada tambem com varias bacterias heterotroficas. Assim, a l-cisteína e a l-cistina são decompostas com a produção de H^2S, referimos em trabalho anterior. Sob a ação do *Proteus vulgaris*, em condições de anoxibiose, por uma corrente de H, Tarr observou a produção de H^2S na seguinte transformação quimica:

$$\begin{aligned} &COOH.\ CHNH^2.\ CH^2S.\ S.\ CH^2.\ CHNH^2.\ COOH + H^2 + 4H^2O \longrightarrow 2H^2S + 2NH^3 + \\ &+ 2CH^3.\ COOH + 2H.\ COOH \\ &\qquad\qquad\qquad\qquad\quad | \\ &\qquad\qquad\qquad\qquad 2H^2 + 2CO^2 \end{aligned}$$

Ficou demonstrada a utilisação do enxofre ou de seus compostos com a existencia constante deste corpo nas cinzas resultantes dos organismos bacterianos.

A decomposição dos elementos sulfurados se faz frequentemente pela oxidação do H^2S ou do S em natureza, produzindo-se combinações sulfuradas, particularmente acidos, H^2SO^4 ou H^2SO^3, ou com redução de H^2SO^4 resultando H^2S.

E' conhecida a produção de H^2S por bacterias desde os trabalhos de Nenki em 1889-90. Proteus, vibrião colerico, bacterias paratificas, coccos, bacterias anaerobias e outras, foram examinadas nesta capacidade, e em certos casos até foi aproveitada a propriedade na determinação especifica de bacterias, como nas brucelas. Certas especies bacterianas, ensaiadas na sua capacidade sulfidrigena foram achadas incapazes de produzir H^2S.

Sempre que uma analise minuciosa era efetuada com varias especies nessa propriedade surgiam duvidas sobre a capacidade decomponedora dos compostos sulfurados por uma ou outra especie, explicadas

muitas vêses como falhas dos indicadores de reação ou dependentes da capacidade proteolitica da bacteria sobre as peptonas dos meios de cultura. Petri & Maassen, em 1893, já haviam notado a influencia da presença de peptona para produção de H^2S, até que Wohlgemuth e outros puderam esclarecer o papel da cistina na sua produção pelas bacterias, bem como variações da quantidade deste corpo nas peptonas do comercio utilisadas em bacteriologia.

Num minucioso estudo da atividade de fermentos sulfidrigenos do *Proteus vulgaris* e da *Serratia marcessens* observou Tarr que de 23 compostos sulfurados de natureza organica, e com enxofre puro, apenas 10 deles e o enxofre puro eram decompostos em H^2S:

	Proteus	*Serratia*
Cisteína	79	80
Cistina	83	80
Glutation	82	78
Glicilcisteína	82	76
N-acetilcisteína, ester metilico	6	2
N-acetilcisteína, ester propilico	2	16
Acido tiolacetico	2	6
Acido alfa-tiolpropionico	2	0
Tiosulfato de sodio	78	0

Exames de varias amostras bacterianas em sua capacidade sulfidrigena em relação á cisteína mostraram, nas mãos de Tarr, variações consideraveis, de 1-78% de H^2S produzido pelas 7 especies bacterianas experimentadas com este corpo.

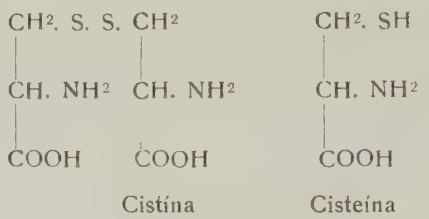
As vantagens dos meios complexos para produção de H^2S, como o caldo peptonado, podem ser explicados por sua riqueza em enxofre. No caldo peptonado a 1% ha 213 mg. de S; juntando-se-lhe gelatina esse teôr sobe a 705 mg. por litro.

Rubner assinalara, antes das verificações de Wohlgemuth, de Sasaki & Otsuka e de Tilley sobre a importancia da cistina como fonte sulfidrigena para as bacterias, que a eliminação dos sulfatos do caldo de cultura não influia na sua produção e que, portanto, não tinham estes compostos qualquer relação na capacidade sulfidrigena bacteriana. Demais, o teôr de sulfatos permanecia inalterado no meio de cultura onde houvera vegetação bacteriana, apezar de entrarem os sulfatos na formação do protoplasma das bacterias. Computando o teôr de S dos sulfatos num caldo de cultura semeado com varias bacterias, verificou Rubner

uma diferença para menos, depois do crescimento bacteriano, com bacterias que não eram sulfidrigenas enquanto que bacterias, sulfidrigenas ou não, nenhuma redução apresentavam nos sulfatos.

Evidentemente a decomposição do enxofre organico é preferencial ao metabolismo bacteriano. Assinala ainda Rubner que as peptonas possuem cistina e taurina na sua composição, deixando antever a participação destes corpos no processo de decomposição do S. Naquele tempo já pensava Rubner dever estar na cistina e na taurina a fonte do enxofre a ser utilisado pelas bacterias, o que foi confirmado por Friedmann em 1902, e mais tarde por outros.

Em presença de alcalis, a cistina e a cisteína se comportam como as proteínas. A analise da formula estrutural destes dois corpos revela como o enxofre está preso na molecula.



Cistína Cisteína

Esta particularidade torna mais facilmente compreensivel a decomposição destes acidos aminados como fonte sulfidrigena para bacterias, foi discutido acima.

As exigencias nutritivas da maioria das bacterias são semelhantes ás dos organismos superiores. Para utilisação dos elementos nutritivos elas possuem, como os demais seres vivos, fermentos capazes de promover modificações tais nas estruturas das substancias nutritivas que as tornem utilisaveis na produção de energia.

Entrando o enxofre como receptor de oxigenio nos processos oxidativos, não admira que todas as bacterias heterotroficas o utilisem, e essa utilisação redunde na produção de H^2S.

Ha muito Petri & Maassen afirmaram que todas as bacterias patogenicas, em condições apropriadas de pesquisa, produzem H^2S. Para comproval-o, em comparação com outros meios de cultura liquidos, utilisaram agua peptonada a 5-10%, substancia quasi sempre muito rica de cistina, sabe-se hoje.

Naquela época ensaiaram eles a capacidade sulfidrigena de proteus, vibrião colerico, bacilos tifico e paratifico, bacilo da tuberculose, coli, bacilo difterico, pasteurela de galinha, *Cl. perfringens*, *Cl. tetani*, e diversos streptococos e estafilococos patogenicos. Viram Petri & Maassen

que a produção de H^2S dependia da bacteria e da natureza do material nutritivo de cultura, influente na curva do crescimento bacteriano, e no teôr de enxofre e consequente clivagem dos corpos sulfidrigenos.

Deante dessa assertiva cogitamos de melhorar o meio de prova para utilisar mais proveitosamente o indicador de bismuto por nós proposto.

Dentre as substancias de uso corrente nos meios de cultura lembramos do figado, orgão particularmente rico de cistina e glutation, cujo teôr orça por 37 mg.% de cistina, e 130-300 mg.% de glutation (forma reduzida).

Os resultados se vêm no quadro 1, onde se anotaram o tempo e o grau de produção de H^2S com as diferentes amostras experimentadas.

Submetidas a provas da produção de H^2S, com indicador de bismuto e com o meio de cultura recentemente proposto por nós para pesquisa deste gaz, todas amostras, comprehendendo representantes da maioria dos generos bacterianos; deram indicação evidente da produção daquele corpo.

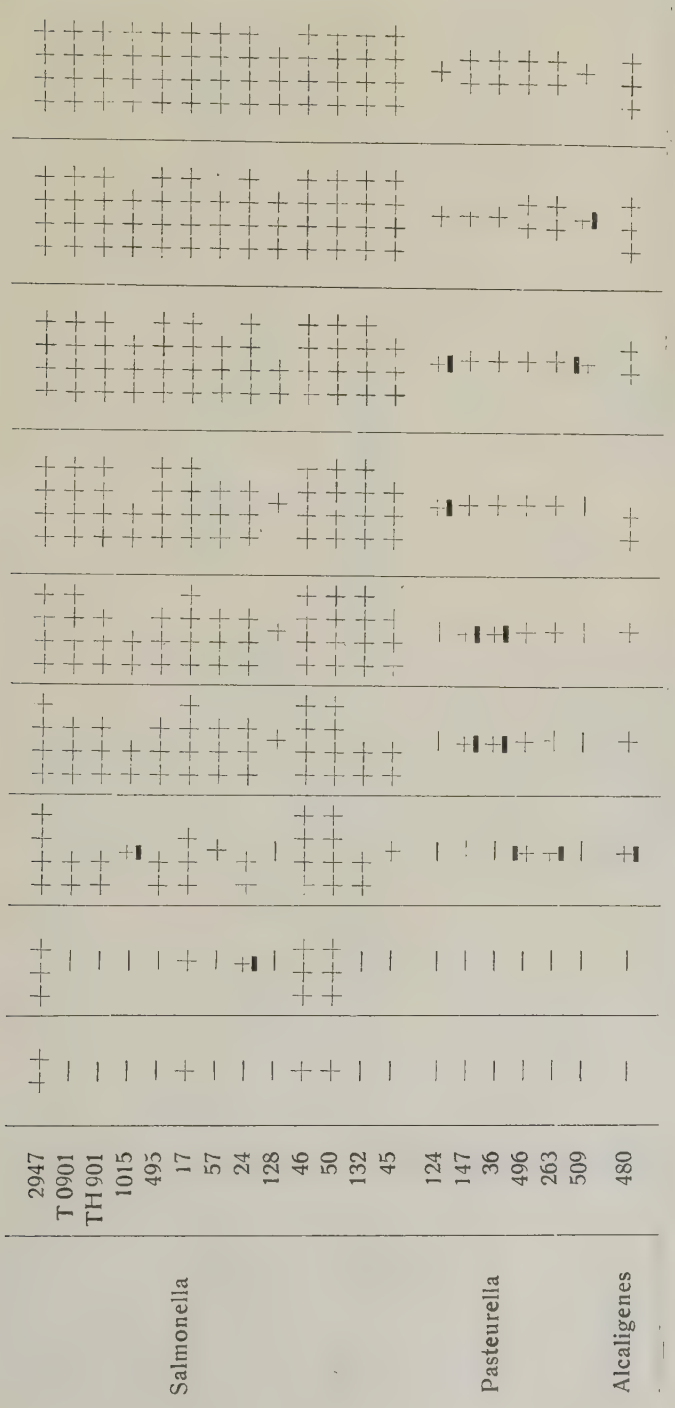
Decorre das considerações do inicio a existencia do S na molecula proteica e derivados dela, e sua importancia no metabolismo bacteriano, particularmente nas bacterias heterotroficas. Conseguiu Tarr extrair das bacterias fermentos capazes de atuar sobre certo numero de compostos organicos sulfoconjugados, com produção de H^2S, independentes da atividade vital das bacterias.

Revistos os elementos dos meios de cultura bacterianos essenciais á atividade sulfidrigena das bacterias, estava vencida uma das dificuldades para o preparo de um meio de cultura apropriado á sua produção. Em verdade, o ideal seria o arranjo de um meio sintetico ao qual se juntasse cistina ou glutation, elementos sulfurados essenciais á produção de H^2S. Mas não raro as bacterias dão-se mal nesses meios, exigentes como são, grande numero delas, de material muito rico de substancias nutritivas. Além disso, o glutation é de custo elevado e nem sempre encontrado no comercio. O meio por nós proposto é rico de glutation e de cistina, substancias referidas como essenciais ao crescimento e á produção de H^2S. Apezar disso juntamos-lhe cistina, em pequena porcentagem. Seu preparo é facil e o custo baixo.

Os resultados foram mais satisfatorios que os anteriormente encontrados por todos os pesquisadores, incluindo-se os de Petri & Maassen e mesmo por nós, como se vê na leitura dos resultados. Anteriormente, pesquisando a produção de H^2S com bacterias anaerobias, verificamos serem todas elas sulfidrigenas, o que nos levou a experimentar a propriedade em bacterias aerobias.

Quadro 1
Producção de H_2S

Genero de bacteria	N.	4 hs.	6 hs.	24 hs.	48 hs.	72 hs.	4 ds.	6 ds.	7 ds.	10 ds.
Aerogenes	558	—	—	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
	428 I	±	+	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	428 II	—	-	±	+	++	++	+++	+++	++++
Staphylo-coccus	548	—	-	—	±	±	±	+	+	++
	553	—	—	—	±	±	+	+	+	++
	485	—	—	—	—	—	±	+	+	++
	111	—	—	—	±	+	+	++	++	+
Escherichia	419	±	+	++	++++	++++	+++	+++	++++	+++
	295	—	—	+++	++++	++++	+++	++++	++++	++++
	490	—	—	±	+	+	+	++	++	+++
	267	+	+	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	511	+	+	+++	+++	++++	++++	+++	++++	+++
	478	-	-	++	++++	++++	+++	++++	++++	+++
	526	+	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++
Shigella	108	—	-	—	—	±	+	+	++	++
	266	—		—	—	±	±	+	+	+
	99	—	—	—	—	±	±	+	+	++
	559	—	-	++	++++	++++	+++	++++	+++	+++
	98	-	—	—	—	—	±	±	+	+
	342	—	—	—	—	±	±	+	+	+
	288	—	-	-	-	±	+	+	+	++
	94	—	-		-	+	±	+	+	+
	232	—	—	—	±	+	+	++	++	++
	87	—	—	—	±	+	+	+	+	+
	329	—	-	—	±	+	+	++	++	+++


Salmonella
Pasteurella
Alcaligenes
2947
T 0901
TH 901
1015
495
17
57
24
128
46
50
132
45
124
147
36
496
263
509
480

Continúação do Quadro 1

		4 hs.	6 hs.	24 hs.	48 hs.	4 ds.	72 hs.	5 ds.	6 ds.	7 ds.	12 ds.
	466		—	—	—	—		—	±	+	++
	214		—	—	—	—		±	±	+	++
Corynebacterium	238 A		—	—	—	—		±	±	++	++
	272		—	—	±	+					
	517			++++	++++			++++	++++	++++	++++
	515			++++	++++			++++	++++	++++	++++
Proteus	519			++++	++++			++++	++++	++++	++++
	518			++++	++++			++++	++++	++++	++++
	390		—	+	+	++					
	377			±	+			++	++	+++	+++
	373			—	±			++	++	++	++
Streptococcus	226			—	—			±	±	±	+
	227			—	—			±	±	±	+
	231		—	+	++	++					
Vibrio	201			±	+			++	+++	++	+++
	167		—	++	++	++					
	74			±	+			+++	+++	++	++++
	385			+++	++++			++++	++++	++++	++++
Pseudomonas	80			±	+			++	++	+++	+++
	387			+	+++			++++	++++	++	++++
Serratia	119			—	—			+	++	++	+++
	118			±	+			++	+++	+++	++++
Sarcina	235		—	++	++	+++					
Bacillus subtilis			—	++	++	++					

| | | |

Quadro 2

RELAÇÃO DAS AMOSTRAS UTILISADAS

ESPECIE	No.	ORIGEM
Acrobacter aerogenes	558	Isolado de fezes humanas em 1939.
Aerobacter aerogenes	428 I	Isolado de fezes humanas em 1939.
Aerobacter aerogenes	428 II	Isolado de fezes humanas em 1939.
Staphylococcus sp.	548	Isolado de piodermite em 1939.
Staphylococcus albus	553	(Hemolitico) Isolado de septicemia em 1939.
Staphylococcus sp.	485	Isolado de conjuntivite em 1939.
Staphylococcus aureus	111	Isolado de furunculose em 1932.
Escherichia sp.	419	Isolado de pielite em 1938.
Escherichia coli	295	Amostra 86 da N. C. T. C.
Escherichia sp.	490	Isolado de pielite em 1939
Escherichia sp.	267	Isolado de fezes em 1936.
Escherichia communior	511	Isolado de baciluria em 1939.
Escherichia paracoli (?)	478	(Paracoli) Isolado de fezes em 1938.
Escherichia anindolicum	526	Amostra 4143 da N. C. T. C.
Shigella paradysenteriae	108	(Tipo Strong) Recebida do Dep. de Microbiol. da Fac. de Med. de São Paulo.
Shigella paradysenteriae	266	(Tipo Y) Isolada no Lab. de Saude Publica no Rio de Janeiro em 1928.
Shigella paradysenteriae	99	(Tipo Schimitz) Isolado de fezes disentericas, em 1928.
Shigella paradysenteriae	559	(Tipo alcalescens) Recebida de Arlindo de Assis em 1940.
Shigella paradysenteriae	98	(Tipo Hiss Russel) Isolada no Instituto Bact. de São Paulo.
Shigella dysenteriae	312	(Tipo Shiga) Recebida do Dr. Cezar Guerreiro.
Shigella paradysenteriae	288	(Tipo Hiss & Russel) Isolada de fezes em 1936.
Shigella dysenteriae	91	(Tipo Shiga) Recebida do Dr. Astrogildo Machado.
Shigella paradysenteriae	232	(Tipo Y) Isolado de fezes em 1936.
Shigella paradysenteriae	87	(Tipo Flexner) Recebido do Dr. Astrogildo Machado.
Shigella paradysenteriae	329	(Tipo Sonne) Isolado de fezes em 1937.
Salmonella Schottmuelleri	2947	Recebida do Instituto Roberto Koch.

ESPECIE	Nº.	ORIGEM
Salmonella typhosa	ГО 901	Recebida do Instituto Roberto Koch.
Salmonella typhosa	ГII 901	Recebida do Instituto Roberto Koch.
Salmonella paratyphi	1015	Recebida do Instituto Roberto Koch.
Salmonella typhosa	495	Isolada de hemocultura em 1939.
Salmonella enteritidis	17	Isolada de boi em 1930.
Salmonella pullorum	57	Amostra B. 15 de Rettger.
Salmonella nocardi	24	Isolada de papagaio em 1930.
Salmonella abortus-equi	128	Recebida de Rosenbuch, Argentina.
Salmonella psittacosis	46	Isolada de periquito em 1930.
Salmonella psittacosis	50	Isolada de papagaio em 1930.
Salmonella gallinarum	132	Isolada por Th. Smith com nome de « Seine et Meuse ».
Salmonella paulensis	45	Isolada de fezes de criança pelo Dr. Salle Gomes em S. Paulo.
Pasteurella boviseptica	124	Isolada de bezerro com pneumoenterite em S. Paulo.
Pasteurella desmodilli	147	Enviada por Pirie, Africa do Sul.
Pasteurella myocastori	36	Isolada de nutria em 1933 em S. Paulo.
Pasteurella avicida	496	Isolada de galinha, em 1939.
Pasteurella suilla	263	Recebida do Prof. Manninger, Estados Unidos.
Pasteurella pestis	509	Enviada pelo Dr. G. Bretz do Serviço Sanit. do E. do Rio.
Alcaligenes fecalis	480	Isolado de fezes em 1938.
Corynebacterium sp.	466	Isolado de garganta em 1938.
Corynebacterium pseudotuberculosis murium	214	(Kutscher) N.º 949 da N. C. T. C.
Corynebacterium Hodgkini	238 A	Isolada em São Paulo em 1932.
Corybacterium diphteriae	272	Recebida do Departamento de Microbiologia da Faculdade de S. Paulo.
Proteus Amostra HXK	517	Recebida do Instituto Butantan.
Proteus Amostra OXL	515	Recebida do Instituto Butantan.
Proteus Amostra HXL	519	Recebida do Instituto Butantan.
Proteus Amostra HX19	518	Recebida do Instituto Butantan.
Proteus sp.	319	Isolado de fezes em 1938.

ESPECIE	Nº.	ORIGEM
Streptococcus fecalis	377	Isolado de fezes em 1938.
Streptococcus fecalis	373	Isolado de fezes em 1938.
Streptococcus equi	266	Isolado de pús de cavalo com garrotilho em 1935.
Streptococcus equi	227	Isolado de pús de cavalo com garrotilho em 1935.
Streptococcus anginosus (?)	231	Isolado de garganta em 1935.
Vibrio comma	201	Amostra da N. C. T. C. recebida do Inst. Bact. de B. Ayres.
Vibrio comma	167	Recebida do Instituto Bacteriologico de Buenos Aires.
Pseudomonas aeruginosa	74	Isolado de pús em 1938.
Pseudomonas aeruginosa	385	Isolada de fezes em 1938.
Pseudomonas aeruginosa	80	Isolada de necrose da orelha de porco em 1931 em São Paulo.
Pseudomonas aeruginosa	387	Isolada de fezes em 1932.
Serratia marcescens	119	Isolada de sólo em 1932.
Serratia marcescens	118	Isolada de sólo em 1932.
Bacillus subtilis	—	Isolado do ar atmosferico.
Sarcina lutea	235	Isolada do ar atmosferico em 1936.
Bacillus megaterium	248	Isolado do ar atmosferico em 1935.
Bacillus anthracis	298	Amostra n.º 60 da N. C. T. C.
Actinobacillus mallei	327	Isolada de cavalo pelo Dr. Adhemar Carvalho.
Brucella paramelitensis	1	Enviada pelo Prof. Mazza, da Argentina.
Brucella abortus	3	Isolada de boi em 1935.
Brucella suis	8	N.º 2 de Huddleson, Estados Unidos.
Brucella melitensis	4	N.º 1671 da N. C. T. C.

Outra dificuldade na pesquisa do H^2S tem sido o indicador de sua presença, assunto discutido em outro trabalho, de que resultou preferencia para o carbonato de bismuto. O meio assim preparado permitiu-nos confirmar a asserção de Petri & Maassen ha 47 anos passados de que todas as bacterias produziam H^2S. O que admira é que seus resultados tenham sido esquecidos e se veja em todos os trabalhos, com relação á propriedade bioquimica de bacterias, quando falam da produção de H^2S, referencia á produção positiva ou negativa desse corpo com esta ou aquela especie bacteriana.

Nossa contribuição sobre o assunto se refere á melhora da tecnica para a pesquisa, quanto ao meio de cultura e ao indicador, permitindo confirmar os resultados de Petri & Maassen ao mesmo tempo que propondo um meio em que a verificação da propriedade sulfidrigena é facil e economica.

A distinção entre bacterias produtoras e não produtoras de H^2S fica assim destituida de importancia, uma vês que é uma propriedade geral das bacterias. Resta somente a questão da quantidade que poderá ter certo valor sistematico no computo das propriedades bioquimicas bacterianas.

SUMARIO

1) Foi pesquisada a produção de H^2S em varias especies da maioria dos generos de bacterias heterotroficas com o meio figado-baço, com indicador de bismuto, ultimamente proposto pelos autores.

2) Todas as especies submetidas á prova com esse meio se revelaram dotadas da capacidade de decompôr os compostos sulfurados do meio de cultura com produção de H^2S.

3) Resulta que todas as bacterias heterotroficas produzem H^2S.

4) Houve variações no teôr de produção entre amostras da mesma especie, entre especies do mesmo genero e de um genero para outro, computado pelo escurecimento maior ou menor do bismuto.

5) Tambem houve diferenças entre os especimens experimentados quanto ao tempo que levaram para produzir H^2S.

6) E' proposta a expressão «capacidade sulfidrigena» para a produção de H^2S pelas bacterias.

SUMMARY

1) Research on the production of H^2S by various species of the majority of the genuses of heterotrophic bacteria was carried out using a liverspleen medium with the bismuth indicator lately proposed by authors.

2) All bacterian species submitted to test on this medium were found capable of decomposing the sulphur compounds in the culture medium with the production of H^2S.

3) It was found that all the heterotrophic bacteria produce H^2S.

4) There were variations in the amounts produced by different strains of the same species, by different species of the same genus and by different genuses, calculated by the greater or lesser darkening of the bismuth indicator.

5) There were also differences between the specimens tested as to the time taken for the production of H^2S.

6) The expression « sulphydrigenous power » is proposed to designate the propertie of H^2S production by bacteria.

LITERATURA

KNIGHT, B. C. H. G.

1938. Bacterial nutrition. London.

KONDO, M.

1923. Bioch. Zeit., **136** : 198.

LOWY & HARROW

1936. An introduction to organic chemistry. New York.

NENCKI

1889. Monat. für Chem., **9** (Apud Kruse-Allg. Mikr. Leipzig, 1910).

PETRI, R. J. & MAASSEN, A.

1893. Beiträge zur biologie der Krankheitserregenden Bakterien insbesondere über die Bildung von Schweffelwasserstoff durch dieselben unter vornehmlicher Berüchsitigung des Schweinerotlauf. Arb. a. d. Keyserges undh., **8** : 318.

PRIDE, J.

1931. Recent advances in biochemistry. London.

PACHECO, G. & COSTA, G. A.

1940. Mem. Inst. Osw. Cruz, **35** (2).

PACHECO, G. & PERES, J. N. & MATTOSO, I. V.

1939. Mem. Inst. Osw. Cruz, **34** (4).

RUBNER, M.

1893. Zeit. f. Hyg., **16**, 35.

SASAKI, T. & OTSUKA, I.

1912. Bioch. Zeit., **39** : 208.

STEPHESON, M.

1939. Bacterial Metabolism. New York-Toronto.

TARR, H. C. A.

1933. The enzyme formation of hydrogen sulphide by certain heterotrophic bacteria. Bioch. J., **27** (2) : 1869.

TILLEY, F. W.

1923. J. Bact., **8** : 287.

WOHLGEMUTH, J.

Zeit. f. phys. chem., **43** : 641.

Sobre um Schizotrypanum dos morcegos Lonchoglossa ecaudata e Carollia perspicillata do Brasil *

pelo

Dr. Emmanuel Dias

(Com 1 estampa)

Em recente excursão á zona do Rio Paraíba compreendendo as estações de Benjamin Constant e de Teixeira Soares, em Minas Gerais, tornámos a examinar o sangue de numerosos morcegos, á cata de hemoparasitos. Já nessa região assinalaramos (Dias, 1936) a infecção por *Schizotrypanum* nas especies *Phyllostomus hastatus* Pallas e *Carollia perspicillata* (L.). Fizemos, outrosim, pesquisas em morcegos do Distrito Federal, desta vês com resultados positivos, ao contrario dos anteriores.

MORCEGOS EXAMINADOS

A pesquisa de tripanosomas no sangue periférico, pelo exame a fresco, foi praticada em 87 exemplares das mencionadas estações de Minas Gerais, tendo sido em alguns casos tambem feito o exame em gotas espessas. Os quirópteros eram examinados vivos ou recentemente mortos, e pertenciam a 9 especies distintas, conforme determinação bondosamente feita pelo Dr. Carlos Vieira, do Museu Paulista, que examinou um grupo de especimens.

A relação abaixo mostra o numero de individuos de cada uma das especies examinadas, á exceção das tres primeiras cuja discriminação não foi possivel no local, tendo-se perdido varios exemplares para fim de classificação.

* Recebido para publicação a 25 de Maio de 1940 e dado á publicidade em Setembro de 1940.

LISTA DOS MORCEGOS EXAMINADOS EM B. CONSTANT E T. SOARES, EM MARÇO DE 1940

	Positivos	Negativos
Carollia perspicillata	1	
Lonchoglossa ecaudata	1	45
Glossophaga soricina	—	
Phyllostomus hastatus	1	26
Vampirops lineatus	—	4
Artibeus jamaicensis	—	2
Chrotopterus auritus	—	1
Molossus rufus	—	4
Myotis nigricans	—	2

No Distrito Federal, capturámos na Estrada da Tijuca alguns Phyllostomideos das especies *C. perspicillata*, *L. ecaudata* e *G. soricina*.

MORCEGOS INFECTADOS

Dentre 47 pequenos Phyllostomideos de Minas Gerais, apenas 2 estavam infectados, *C. perspicillata* e *L. ecaudata*, sendo negativos os da especie *G. soricina*. Estas tres especies parecem viver em conjunto, ou pelo menos acoitam-se em logares proximos, de preferencia casas velhas abandonadas, porões e forros escuros, boeiros. Em 1935 encontrámos um unico *C. perspicillata* infectado em B. Constant, contra 26 negativos (Dias, 1936).

No Distrito Federal achámos tambem diversos *L. ecaudata* e *C. perspicillata* parasitados, porém não apurámos exatamente a percentagem de infecção. E' esta a primeira vês que se assinala o parasitismo natural da especie *L. ecaudata* por *Schizotrypanum*.

E' interessante notar que dentre os morcegos negativos de B. Constant e de T. Soares (v. relação acima), ha tres especies que foram assinaladas com hemoflagelados em outras regiões: *Vampirops lineatus*, na Venezuela (Iturbe & Gonzalez, 1916); *Artibeus jamaicensis jamaicensis*, no Panamá (Clark & Dunn, 1932); *Myotis nigricans*, no Brasil (Dias, 1933, 1934), na Argentina (Romaña, 1936) e na Venezuela (Pifano, 1939). A sub-especie *Glossophaga soricina leachii* é um outro depositario panamense conhecido (Clark & Dunn, 1932).

No sangue de *L. ecaudata* e de *C. perspicillata* do Rio de Janeiro, encontrámos, além de um *Schizotrypanum*, um grande tripanosoma do grupo *megadermae* (Dias, 1936) muito parecido com o *Trypanosoma*

heybergi Rodhain (1923) do *Nycteris hispidus* do Congo Belga. Este parasito será estudado em outro trabalho. *C. perspicillata* tambem se mostrou infectada pela *Bartonella rocha-limai* Faria & Pinto, 1926.

Passemos ao estudo do *Schizotrypanum* de *C. perspicillata* e *L. ecaudata*.

MORFOLOGIA DO PARASITO NO SANGUE

O parasito apresenta morfologia identica no sangue periférico de ambas especies de morcegos, tanto nos de Minas como nos do Distrito Federal. O tripanosoma é de pequenas dimensões e dotado de blefaroplasto não muito volumoso, localisado sobre o extremo posterior ou em posição sub-terminal. O corpo é geralmente incurvado em fórma de C, sendo mais espessado na parte postero-nuclear. O nucleo, ovoide ou esférico, fica bem próximo á extremidade flagelada. Flagelo livre curto, membrana ondulante estreita, quasi virtual. Protoplasma algumas vêses finamente granuloso. Em alguns individuos nota-se aparente ausencia de blefaroplasto.

Do sangue de *C. perspicillata* de B. Constant, em esfregaços fixados pelo alcool absoluto e corados pelo Giemsa, foram medidos 26 tripanosomas com curvimetro, após marcação á camara clara, obtendo-se as médias abaixo:

Extremidade posterior ao meio do nucleo	6,8 μ
Meio do nucleo á extremidade anterior	2,6 μ
Flagelo livre	5,2 μ
Comprimento total	14,6 μ

FÓRMAS DE MULTIPLICAÇÃO

No sangue dos morcegos não foram observados tripanosomas em via de divisão.

Nos cortes de coração de um *L. ecaudata* (fig. 2) foi encontrado um aglomerado parasitario composto por numerosos elementos em fórma de leishmania, aparentemente situado no interior da fibra muscular. O exame de outros orgãos resultou negativo, assim como a pesquisa nos orgãos de um *C. perspicillata*.

XENODIAGNOSTICO

Um *L. ecaudata* de B. Constant naturalmente infectado foi sugado por diversos barbeiros normais, cuja observação foi a seguinte:

24-3-940: Data da sucção, por varios *T. infestans* e *R. prolixus*.

20-4-940: Foram dissecados e examinados 3 *R. prolixus* e 2 *T. infestans*, com resultado negativo. Em esfregaços corados de estomago de *T. infestans* não foram encontrados parasitos.

29-4-940: Dissecado e examinado 1 *T. infestans*, negativo.

6-5-940: Sacrificados 1 *T. infestans* e 1 *R. prolixus*, negativos.

O xenodiagnostico foi portanto negativo em 4 *T. infestans* e 4 *R. prolixus*, não obstante ter sido feito em morcego com tripanosomas não muito raros no sangue, ao exame a fresco.

Um *C. perspicillata* de B. Constant foi tambem sugado por 1 *T. infestans* e 2 *P. megistus* normais, os quais não mostraram flagelados no intestino, ao serem examinados dias mais tarde, apezar do morcego ter mostrado varios parasitos no sangue, a fresco, no dia em que foi sugado.

Em 1935 obtiveramos identico resultado, em morcego da mesma especie e da mesma região que o anterior, o qual foi sugado por 3 *P. megistus* que estavam negativos ao fim de 78, 98 e 147 dias (Dias, 1936, p. 36).

No quadro abaixo estão reunidos os resultados dos xenos por nós realisados nestas duas especies de quirópteros, os quais são sugestivos da incapacidade das fórmas sanguicolas do seu *Schizotrypanum* se desenvolverem nas especies de reduvideos experimentadas.

XENODIAGNOSTICOS PRATICADOS EM *L. ECAUDATA* E *C. PERSPICILLATA* INFECTADOS (BENJAMIN CONSTANT)

MORCEGO	BARBEIRO	RESULTADO
Lonchoglossa ecaudata	4 *T. infestans*	Negativo
Lonchoglossa ecaudata	4 *R. prolixus*	Negativo
Carollia perspicillata	3 *P. megistus*	Negativo
Carollia perspicillata	2 *P. megistus*	Negativo
Carollia perspicillata	1 *T. infestans*	Negativo

INOCULAÇÃO A ANIMAIS

O *Schizotrypanum* em estudo não se mostrou transmissivel a animais de laboratorio. Já em 1935 obtiveramos inoculações negativas em 2 camondongos, inoculados com sangue de *C. perspicillata* de B. Constant (Dias, 1936). Recentemente, injetámos sangue do mesmo morcego e do mesmo local em 1 cobaia e 3 camondongos, que não só ficaram nega-

tivos como mostraram-se depois sensiveis á infecção por outras amostras de *Schizotrypanum*.

Eis a observação dos animais, que foram todos inoculados com sangue de uma *Carollia* no dia 26-3-40:

Cobaia 758 — Até o dia 4-6-40 teve 20 exames a fresco negativos. Foi então reinoculada, com sangue do camondongo 814, infectado com a amostra *phyllostomae:* teve exame positivo a 21-6-40, em seguida a mais 4 exames negativos. Chegou a ter infecção muito intensa.

Camondongo 761 — Como o animal anterior, teve 20 exames negativos até 4-6-40. Reinoculado com a amostra *phyllostomae,* apresentou tripanosomas no sangue tambem no dia 21-6-40. Infecção prolongada.

Camondongo 762 — Após 12 exames negativos até 8-5-40, foi inoculado com a amostra *phyllostomae* (sangue dos camondongos 769 e 770); continuou negativo até 24-5-40, aparecendo tripanosomas ao exame de 28-5-40. Morreu positivo em 2-6-40.

Camondongo 760 — Até 29-4-40 teve 9 exames negativos. Reinoculado (*S. cruzi*, amostra *vickersae*) neste dia, teve exame positivo a 7-5-40, tendo sido sacrificado, ainda infectado, a 18-6-40.

CULTURA

O *Schizotrypanum* de *Carollia perspicillata* é cultivavel em meio de Noguchi. Isolámos o parasito anteriormente (Dias, 1936) de morcego de B. Constant, e de novo, no Distrito Federal. Nas culturas desenvolvidas encontram-se parasitos critidiomorficos e tripaniformes. Ainda está por ser feito o estudo comparativo das fórmas culturais deste flagelado com as de outros do mesmo genero.

DISCUSSÃO

Segundo as investigações levadas a cabo no presente trabalho, os morcegos *Carollia perspicillata* e *Lonchoglossa ecaudata* de Minas Gerais e do Distrito Federal apresentam-se naturalmente infectados por um flagelado do genero *Schizotrypanum*. Trata-se de um flagelado não transmissivel a animais de laboratorio (cobaia, camondongo), cultivavel *in vitro*, que não se mostrou capaz de evoluir em diversos reduvideos (*Panstrongylus megistus*, *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*) transmissores do *Schizotrypanum cruzi*.

No sangue de ambos os hospedeiros o parasito caracterisa-se morfologicamente: 1.º pelo pequeno comprimento total; 2.º pela situação do

nucleo, muito proximo á extremidade anterior do corpo. As formas de tripanosoma são muito semelhantes ás do *S. vespertilionis* (Battaglia), conforme o demonstram as ilustrações do presente trabalho (figs. 1 e 2). Quasi todos os autores que estudaram os tripanosomas do sangue de morcegos europeus ou africanos (*S. vespertilionis*) chamam a atenção para a colocação do nucleo « mais proximo » ou « muito proximo » ao extremo anterior do corpo do protozoario: Battaglia (1904), Sergent (1905), Kisskalt (1906), Nicolle & Comte (1906), Bettencourt & França (1907) Gonder (1910), Coles (1914), Chatton & Courrier (1921), assinalando tambem, alguns deles, o pequeno tamanho do parasito. Bettencourt & França (1907) dão uma perfeita descrição do *S. vespertilionis* dos quirópteros de Portugal, identificando-o ao *Trypanosoma nicolleorum,* ao *T. dionisii* e aos tripanosomas estudados por Petrie (1905) e Kisskalt (1906), após terem examinado o material original destes pesquizadores. Assinalam que o nucleo quasi sempre está a apenas 1,5 μ do ponto de onde emerge o flagelo livre, isto é, muito anteriormente situado. Gonder (1910, p. 296) chega a afirmar: « Die Trypanosomen aus dem Blute der Fledermäuse sind... vor allem durch die Lage ihrer Kerne charakterisiert; der Kern liegt weit im Vorderende, der Blepharoplast ganz im Hinterende ».

Com respeito a outros flagelados de morcegos americanos, o *Schizotrypanum* em estudo parece assemelhar-se sómente ao do *Myotis nigricans*, que, além de ter o nucleo situado muito para a frente, não se mostrou nem inoculavel a animais nem transmissivel pelo *T. infestans*. Os dados disponiveis sobre a morfologia e a biologia da maioria dos parasitos até agora encontrados, entretanto, são ainda muito incompletos para que possamos identifica-los ou diferença-los uns dos outros. No quadro n.º 2 colocamos os resultados até agora conhecidos de inoculações em animais, xenodiagnostico e exame histologico em quirópteros do Novo Mundo, chamando especial atenção para os resultados negativos de xenodiagnostico, que são talvez indicação de que possivelmente se trata, nesses casos, de parasitos do tipo « vespertilionis ». Referimo-nos aqui a este tipo no sentido estricto definido neste trabalho (forma sanguicola pequena, de nucleo bem anterior), e não ao tipo vespertilionis na accepção ampla que demos em trabalho anterior (Dias, 1936), que abrangia todos os parasitos do genero *Schizotrypanum*.

De acordo com os resultados de um estudo biometrico de varios parasitos deste genero (Dias & Freitas), foram verificadas diferenças morfologicas significativas entre diversas amostras de distinta procedencia, diferenças essas que dizem respeito sobretudo á posição do nucleo. No quadro n.º 1 comparamos as medidas médias e extremas que obti-

Quadro 1

Medidas obtidas de tripanosomas do sangue periferico, desenhado á camara clara e metidos com curvimetro (alcool absoluto Giemsa).

AMOSTRA	P. N.			N. A.			Flagelo			Total			PN/NA	Tripanosomas medidos
	Mn.	Mx.	Md.	Mn.	Mx.	Md.	Mn.	Mx.	Md.	Mn.	Mx.	Md.	Md.	
Vespertilionis	5,4	8,5	6,8	1,8	4,2	2,6	3.6	6,7	5,2	11,4	17.0	14,6	2,6	26
Cruzi humano	4,9	9,1	6,7	2,1	5,9	4,0	5,2	8,4	6,7	13,6	20,6	17,4	1,6	100
Phyllostomae	4,8	9,1	7,1	3,0	6,7	5,0	5,4	9,7	7,8	15,1	23,6	20,0	1,4	100
Hastatus	4,5	8,7	6,4	4,2	8,0	6,2	5,4	10,5	7,7	16,2	25,1	20,4	1,0	100

P. N. — Distancia do extremo posterior ao meio do nucleo.

N. A. — Distancia do meio do nucleo ao extremo anterior do corpo.

PN/NA — Relação que exprime a posição do nucleo.

vemos de 26 tripanosomas do sangue de *Carollia perspicillata* de Minas Gerais (amostra « vespertilionis »), com as obtidas de 100 tripanosomas de cada uma das amostras « cruzi », « phyllostomae » e « hastatus ». As duas ultimas são de morcegos, respectivamente de *Carollia perspicillata* da Venezuela e de *Phyllostomus hastatus* do Brasil. Denominamos « phyllostomae » a uma delas por corresponder, pela morfologia das formas sanguicolas, ao *Trypanosoma phyllostomae* Cartaya 1910, descrito no morcego *C. perspicillata* de Cuba. Ao descrever este parasito o autor assinalou que « El (tripanosoma) que hemos encontrado en el *A. perspicillatus* y que provisionalmente nombraremos *Trypanosoma phyllostomae* no parece corresponder en sus medidas á ninguno de los anteriores », isto é, ao *T. vespetilionis* e outros até então descritos em sangue de morcegos.

A amostra que medimos de *C. perspicillata* da Venezuela, e sobre a qual Dias & Pifano estão por publicar um trabalho, é um *Schizotrypanum* patogenico para os animais de laboratorio e transmissivel por barbeiros e outros hematófagos. Biometricamente ela se distingue tambem do *Schizotrypanum cruzi* humano e do *Schizotrypanum* do morcego *Phyllostomus hastatus*.

As tres amostras (*cruzi*, *phyllostomae* e *hastatus*) diferem morfologicamente da « vespertilionis » pelas suas dimensões maiores e pela situação do nucleo mais medianamente, e biologicamente por evoluirem facilmente em reduvideos. Além disto, as amostras « phyllostomae » e « cruzi » são inoculaveis a diversos animais. A « hastatus », que biometricamente é a que mais se distancia da « vespertilionis », tem em comum com esta a não transmissibilidade aos animais de experiencia, só excepcionalmente conseguida (Dias, 1936). Com toda a razão afirmou Rodhain (1939) não ser o *Schizotrypanum* do *Phyllostomus hastatus* morfologicamente identico ao *S. vespertilionis* dos morcegos europeus, que ele teve oportunidade de estudar.

Do ponto de vista morfologico o *Schizotrypanum cruzi* ocupa logar intermediario entre as amostras *phyllostomae* e *vespertilionis*, tanto pelo tamanho como pela posição do nucleo; e a *phyllostomae* é intermediaria entre a *cruzi* e a *hastatus* (v. quadro 1).

Os 4 tipos de *Schizotrypanum* em consideração, não obstante as diferenças assinaladas, têm caracteres morfologicos e biologicos comuns, tais como: aspéto geral dos tripanosomas, com blefaroplasto mais ou menos volumoso sub-terminal ou terminal; indivisibilidade das formas sanguicolas adultas; proliferação nos tecidos sob a forma de leishmania; cultivabilidade *in vitro*; evolução em « posterior station » no transmissor (nem sempre conhecido).

Com relação ás formas proliferativas, refiramos que no *Pipistrellus pipistrellus* da Europa elas foram assinaladas primeiramente por Coles (1915) como « immature trypanosomes », sendo depois referidos os « quistos critidianos » de Chatton & Courrier (1921) e finalmente encontradas leishmanias por Franchini (1922).

Pelo quadro n.º 2 podemos observar que em muitos morcegos americanos infectados até agora não foram encontrados os elementos de multiplicação.

O *S. vespertilionis* dos morcegos europeus e africanos tem em comum com o parasito que estudamos, além da morfologia dos tripanosomas sanguicolas, a não infectividade para animais, que foi comprovada no primeiro pela grande maioria dos autores. Com respeito ao xenodiagnostico, não sabemos de ensaios praticados com barbeiros em morcegos de outros continentes; entretanto Rodhain (1939), trabalhando com culturas do *S. vespertilionis*, que fazia ingerir por hematófagos, observou a prolongada sobrevivencia dos flagelados no organismo de *Panstrongylus megistus, Cimex lectularius* e *Ornithodoros moubata.*

RESUMO E CONCLUSÕES

1) Fica assinalada a infecção natural dos Phyllostomideos *Lonchoglossa ecaudata* e *Carollia perspicillata* no Estado de Minas Gerais e na cidade do Rio de Janeiro, Brasil, por um *Schizotrypanum.*

2) Em ambos os morcegos as formas de tripanosoma apresentam morfologia identica, caracterisada principalmente por suas pequenas dimensões (15 μ) e pelo nucleo localisado muito proximo ao extremo anterior do corpo.

3) Tais caracteristicas morfologicas são muito visinhas, sinão identicas, ás do *Schizotrypanum vespertilionis* (Battaglia), e distinguem o parasito em estudo do *Schizotrypanum cruzi* humano, de um *Schizotrypanum* do morcego *Carollia perspicillata* da Venezuela (= *T. phyllostomae* Cartaya?) e do *Schizotrypanum* do morcego *Phyllostomus hastatus* do Brasil.

4) Em córtes de coração de *Lonchoglossa ecaudata* foram encontrados parasitos com a morfologia de leishmania.

5) Xenodiagnosticos realisados com *Panstrongylus megistus*, *Tria-*

Quadr

Dados biologicos existentes sobre hemo flagelados dos mor

xenodiagnostico e formas de

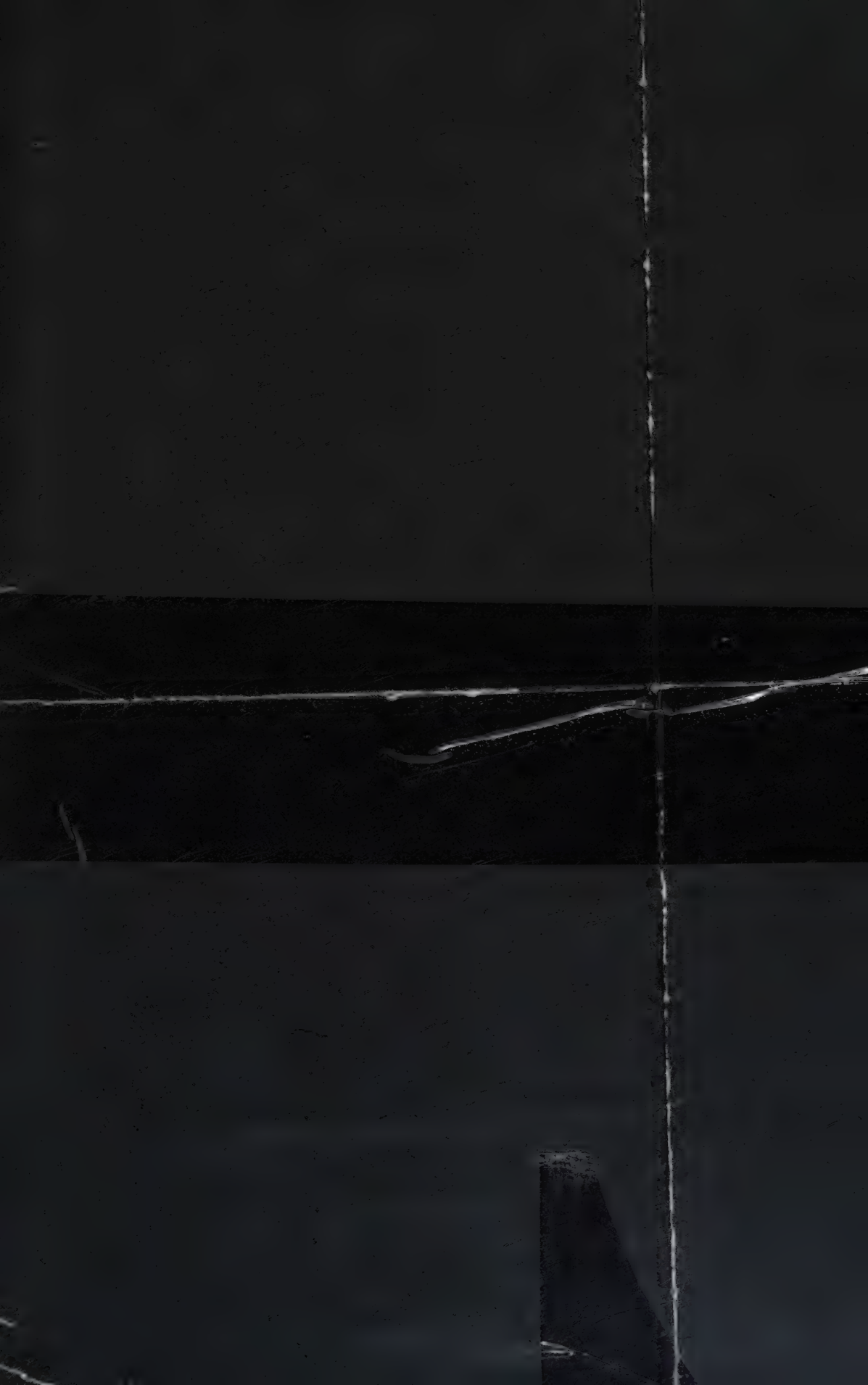
MORCEGO		INOCULAÇÃO		
Familia	Especie	Animal	Material	Resultado
Noctilionidae	*Dirias albiventer*	—	—	—
	Nyctinomus macrotis	Camondongo	sangue	negativo
Molossidae	*Molossus obscurus*	Cobaia	barbeiro	negativo
	Eumops bonariensis beckeri	Camondongo	barbeiro	positivo
	Myotis nigricans	Camondongo, rato	sangue	negativo
	Myotis dinellii	—	—	—
Vespertilionidae	*Antrozous pallidus pacificus*	—	—	—
	Histiotus laephotis	Camondongo	sangue	negativo
	Histiotus montanus	—	—	—
Phyllostomidae	*Phyllostomus hastatus*	diversos	sangue cultura	negativo
	Carollia perspicillata (Venezuela)	diversos	barbeiro cultura	positivo
	Carollia perspicillata, (Brasil)	Cobaia, camondongo	sangue	negativo
	Lonchoglossa ecaudata	—	—	—
	Artibeus jamaicensis jamaicensis	rato	sangue	positivo

) 2

:egos do Novo Mundo, relativos a inoculação em animal,

multiplicação nos tecidos.

	XONODIAGNOSTICO		HISTOLOGIA	AUTORIDADE
	Especie	Resultado	Resultado	—
	—	—	negativo	Dias 1936
	—	—	negativo	Mazza 1935, 1940, Dias 1936
	R. prolixus *E. nigromaculata*	positivo negativo	positivo	Pifano 1939
	T. infestans	positivo	negativo	Dias & Romaña 1939
	T. infestans	negativo	negativo	Dias 1933-34, Romaña 1939 Dias 6 Romaña 1939, Mazza 1940
	—	—	negativo	Mazza 1940
	T. infestans	negativo	negativo	Dias & Romaña 1939
	—	—	negativo	Mazza 1940
	—	—	negativo	Mazza 1940
	diversas	positivo	positivo	Dias 1939[a]; 1934; 1936
	diversas	positivo	positivo	Dias & Pifano
	P. megistus *T. infestans*	negativo	negativo	Dias (1940)
	T. infestans *R. prolixus*	negativo	positivo	Dias (1940)
	—	—	—	Clark & Dunn 1932



toma infestans e *Rhodnius prolixus*, em morcegos com tripanosomas no sangue ao exame a fresco, resultaram negativos.

6) Em ambas as especies de morcegos, no Rio de Janeiro, foi encontrado tambem um grande tripanosoma do grupo *megadermae*, parecido com o *Trypanosoma heybergi* Rodhain do morcego africano *Nycteris hispidus*. Em *C. perspicillata* da mesma cidade foi verificada tambem a infecção pela *Bartonella rocha-limai* Faria & Pinto, e tambem a presença de microfilarias no sangue. No rim de *C. perspicillata* de B. Constant encontrámos fórmas esquisogonicas de um protozoario.

AGRADECIMENTOS

Expressamos nosso reconhecimento aos Drs. Oliverio M. de Oliveira Pinto e Carlos Vieira, do Museu Paulista, pela determinação dos nossos morcegos. E aos Srs. Dr. Romeu Ramos, Luiz Monteiro, Boanerges Tostes e Carlos Ramos, pelo entusiasmo com que nos auxiliaram na obtenção do material de estudo.

SUMMARY

1) Infection by a flagellate of the genus *Schizotrypanum* has been detected in the bats *Lonchoglossa ecaudata* and *Carollia perspicillata* from Minas Geraes and Rio de Janeiro, D. F.

2) The blood trypanosome forms are characterized by its short length (15 μ) and by its nucleus situated very near the anterior end of the body.

3) Morphologically the parasite is closely related, if not identical to *Schizotrypanum vespertilionis* (Battaglia), and it differs from *Schizotrypanum cruzi* Chagas, from a *Schizotrypanum* of *Carollia perspicillata* from Venezuela (= *Trypanosoma phyllostomae* Cartaya?) and from the *Schizotrypanum* of *Phyllostomus hastatus*.

4) Leishmania bodies have been found in sections of heart of *Lonchoglossa ecaudata*.

6) Xenodiagnostics perfomed on infected bats of both species proved negative with several species of bugs (*Panstrongylus megistus, Triatoma infestans, Rhodnius prolixus*).

6) A large Trypanosome similar to *T. heybergi* Rodhain has been encountered in the blood of *C. perspicillata* and *L. ecaudata* from Rio de Janeiro, D. F. *C. perspicillata* from this city also filaria. Schizogonic forms of a protozoa have been found in the kidneis of *C. perspicillata* from B. Constant.

BIBLIOGRAFIA

Battaglia, M.

1904. Ann. Med. Navarra, **7** (2) : 254. Citado por Bettencourt & França, 1907.

Bettencourt, A. & França, C.

1907. Arch. R. Inst. Bact. Camara Pestana, **1** : 187-194.

Cartaya, J. T.

1910. Sanidad & Beneficencia (Habana), **3** : 507.

Chatton, E. & Courrier, R.

1921. C. R. Soc. Biol., **84** : 943; C. R. Acad. Sc., **172** : 1954.

Clark, H. C. & Dunn, L. H.

1932. Am. Jl. Trop. Med., **12** : 49.

Coles, A. C.

1915. Parasitology, **7** : 17-61.

Dias, E.

1933 *a*. Memorias do Inst. Oswaldo Cruz, **27** : 139.

1933 *b*. Tése de Doutoramento, Rio de Janeiro.

1934. Memorias do Inst. Oswaldo Cruz, **28** : 1-111.

1936. IX Reunião da Soc. Argentina Pat. Regional (M. E. P. R. A.), **1** : 10-88

Dias, E. & Freitas, L.

Em impressão.

Dias, E. & Pifano, C. F.

Em impressão proxima.

Dias, E. & Romana, C.

1939. Memorias do Inst. Oswaldo Cruz, **34** (4) : 619-625.

Faria, J. G. & Pinto, C.

1926. Boletim Biol., São Paulo (2) : 21-23.

Franchini, G.

1922. Bull. Soc. Pat. Ex., **14** : 542.

Gonder, R.

1910. Centr. f. Bakt., Orig., **53** : 293.

Iturbe, J. & Gonzalez, E.

1916. Ref. Trop. Dis. Bull., **9** : 342.

Kisskalt, K.

1906. Centr. f. Bakt., Orig., **40** : 213.

Mazza, S.

1935. Publ. n.º 22, M. E. P. R. A.

1936. IX Reunião da Soc. Argentina Pat. Regional, **1** : 172.

1940. Publ. n.º 45, M. E. P. R. A. : 119-134.

Nicolle, C. & Comte, C.

1906. C. R. Soc. Biol., **58** : 736.

Petrie, G. F.

1905. Jour. Hyg., **5** : 191.

Pifano, F.

1939. Policlinica Caracas, n.º 46, Junho.

1939. Gaceta Med. Caracas, **47** (22) : 435-436.

Rodhain, J.

1923. Bull. Soc. Pat. Ex., **16** : 659.

1939. C. R. Soc. Biol., **131** (19) : 814-818.

Romana, C.

1936. IX Reunião Soc. Arg. Pat. Reg., **1** : 232-234.

Sergent, E. & Sergent, E.

1905. C. R. Soc. Biol., **58** : 53.

Estampa 1

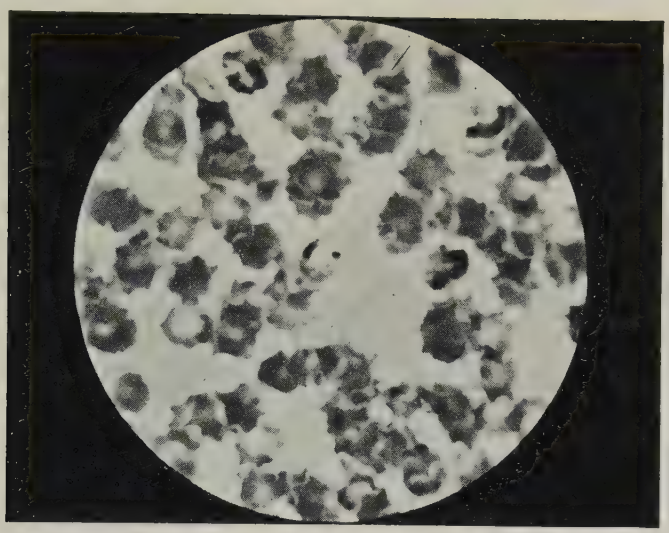
Fig. 1 — Tripanosoma do sangue periférico de *Carollia perspicillata* de Benjamin Constant. Alcool absoluto, Giemsa. 1500 vêses.

Fig. 2 — *Tripanosoma vespertilionis* no sangue de morcegos europeus, segundo Bettencourt & França (1907, estampa 3, fig. 3) e Coles (1915, plate II, figs. 8, 9 e 11). Vêem-se os « immature trypanosomes » de Coles.

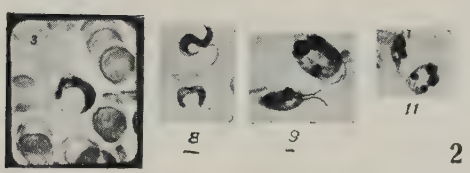
Fig. 3 — Fórmas de leishmania do coração de *Lonchoglossa ecaudata* de Benjamin Constant. Formol, Hematoxilina-Eosina. 1500 vêses.

Foto M. Cezar

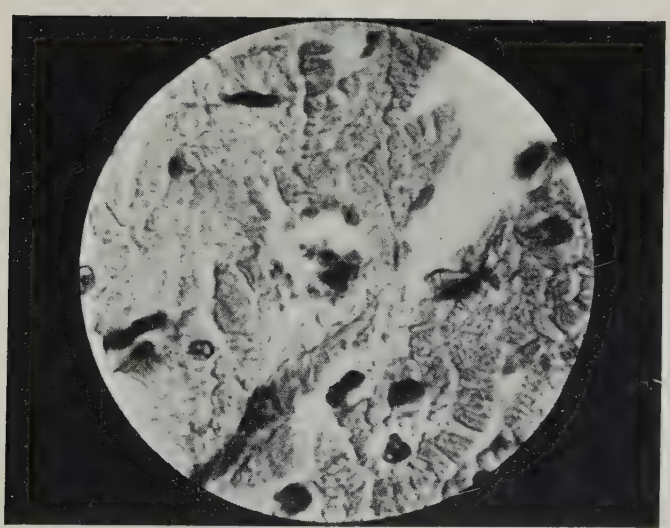
S. E. G. E., I. O. C.



1



2



3

Nota: O aumento das figuras 1 e 3 é de 1240 vezes, e não de 1500 conforme consta na explicação da estampa.

Dias: *Schizotrypanum* de morcegos.

Sur les mallophages des marsupiaux d'Australie *

(Mallophaga: Boopidae)

par

Fabio Leoni Werneck et Gordon B. Thompson

(Avec 66 figs. dans le texte)

Les mallophages des marsupiaux d'Australie sont des parasites mal connus, malgré l'intérêt qu'ils présentent pour l'ensemble de cet ordre d'insectes. Très peu d'auteurs en ont fait l'object de leurs recherches. Aussi n'existe-t-il pas beaucoup de travaux sur ce sujet; il n'en existe pas surtout un seul d'accord avec les besoins des entomologistes specialisés de notre époque.

Piaget publia le premier, il y a soixante ans, des descriptions bonnes pour l'époque, mais devenues aujourd'hui presque inutiles. Quoique plus récentes, celles de Le Souëf et de Mjöberg laissent, à notre avis, encore plus à désirer. Sans doute, le meilleur travail paru est celui de Harrison & Johnston, le seul qui nous permette un aperçu général sur les Boopidés. Ayant pu obtenir une très belle collection, ces auteurs ont établit les bases de l'étude systematique de ce groupe. Ils ont, en plus, saisi d'une façon irréprochable tous les caractères morphologiques variables d'espèce à espèce; aucun ne leur a échapé, même ceux dont ils ne se sont pas servi pour pousser plus loin l'analyse du matériel. Mais, malheureusement Harrison & Johnston ne se sont pas occupés de la plus part des anciennes espèces.

Dans ces conditions il était impossible de reprendre l'étude de ces mallophages, de façon plus approfondie, sans combler cette lacune. C'est ce que nous avons essayé de faire, profitant d'une occasion exceptionnelle d'examiner le matériel ayant servi aux auteurs anciens et en écartant, de cette manière, toute cause d'erreur. Nous regrettons de n'avoir pu resoudre quelques questions, et d'être obligés de remettre à plus tard l'étude du genre *Heterodoxus*. Malgré tout, nous osons espérer que notre travail rendra plus facile la tâche de ceux que voudront poursuivre les recherches sur les Boopidés.

---

* Remis à la rédaction des Mémoires le 26 Mars 1940 et publié au mois de Septembre de la même année.

Nous ne savons pas s'il est raisonnable de réunir les mallophages des marsupiaux d'Australie dans une famille particulière. Le nom *Boopidae* n'est donc employé ici que pour les désigner d'un seul mot. Certes, il s'agit d'espèces possedant plusieurs caractères communs, mais nous n'osons pas envisager la question de savoir si ceux-ci suffisent pour leur accorder un tel rang. Pour être en mesure d'avoir un avis personnel sur ce sujet, il nous faudrait des connaissances sur l'ensemble de l'ordre que nous n'avons pas pu encore acquérir. Il nous semble, cependant, qu'on a exagéré de beaucoup la valeur des caractères anatomiques exclusifs a ces parasites.

Nous croyons avoir attiré suffisamment l'attention, au cours de ce travail, sur tout ce qui permet de reconnaître chacune des espèces d'un même genre, pourtant si proches. Ces différences, quoique fort petites, sont nettes et ne peuvent laisser subsister aucun doute. Malheureusement il nous a été impossible d'étudier, comme nous l'aurions désiré, celles qui se trouvent dans l'armature génitale des mâles. Il y a, en effet, sur les parois de la « vesicula-penis » des pièces chitinisées tout autour du penis formant ce que Harrison & Johnston appelent le mesosome, caractéristique pour chaque espèce et fournissant très probablement le meilleur moyen de les reconnaître. D'après ces auteurs l'aspect du mesosome change souvent et il y a toute une série d'aspects intermédiaires entre des formes extrêmes. Ceci est exact et on peut constater la véracité de cette affirmation quand on examine des parasites pris sur des hôtes différents. Par contre, on est frapé de l'immutabilité de ces structures quand il s'agit de matériel trouvé sur le même hôte. Nous avons examiné entre autres un grand nombre de spécimens de *Heterodoxus spiniger* rencontrés sur des chiens domestiques des régions les plus éloignées d'Amérique du Nord et d'Amérique du Sud, d'Europe, d'Afrique, d'Asie et d'Australie: jamais nous n'avons trouvé la moindre différence. Nous croyons donc qu'elles n'existent pas sur les individus d'une même espèce.

L'étude du mesosome n'est pas très difficile comme on pourrait le supposer au premier abord, car assez vite on commence à trouver les analogies entre les pièces qui les composent et les différences spécifiques qu'elles présentent. Une fois accompli ce travail par des spécialistes, et nous convenons qu'il faut avoir des yeux experts, l'identification des espèces sera chose aisée. Il semble que chaque espèce pourra être reconnue par un aspect particulier du mesosome facile à saisir; au moins nous l'espérons.

Mais ces recherches demandent un matériel abondant, parfaitement conservé et pouvant fournir de bonnes préparations. Malheureusement, la plupart de celles que nous avons pu examiner avaient ces structures,

si délicates, déplacées, tordues, déchirées. Nous avons, tout de même, essayé de les dessiner dans l'espoir que ces mauvais dessins pourront rendre quelque service.

TABLE DICHOTOMIQUE POUR LA DÉTERMINATION DES GENRES DE LA FAMILLE *BOOPIDAE*.

1	Les 3 premiers anneaux de l'abdomen sans poils sensitifs. Palpes maxillaires de moins de 4 articles	2
1'	Les 3 premiers anneaux de l'abdomen avec des poils sensitifs. Palpes maxillaires de 4 articles	3
2 (1)	Palpes maxillaires de 2 articles	*Latumcephalum*
2'	Palpes maxillaires de 3 articles	*Paraboopia*
3 (1')	Sinus antennaux non entièrement couverts par la face supérieure de la tête, dont les bords ont une échancrure donnant aux tempes une forte saillie latérale	4
3'	Sinus antennaux entièrement recouverts par la face supérieure de la tête, dont les bords sont à peu près droits. Tempes peu saillantes	6
4 (3)	La face inférieure de la tête sans aucun épaississement cuticulaire, spinuleux	*Boopia*
4'	La face inférieure de la tête avec une paire d'épines formées par des épaississements cuticulaires fortement chitinisés	5
5 (4')	Les épines sont au niveau des yeux. L'insecte a l'aspect général du genre *Boopia*	*Phacogalia*
5'	Les épines sont tout près des palpes maxillaires. L'insecte a l'aspect général du genre *Heterodoxus*	*Dendrolagia*
6 (3')	Des épaississements cuticulaires aigus a la face inférieure de la tête, près des palpes. Stigmates apparemment sur les tergites abdominaux	*Heterodoxus*
6'	Pas d'épaississements pareils, quoique il puisse exister des poils courts et forts, comme des épines. Stigmates sur les pleurites abdominaux	*Paraheterodoxus*

Genre **Boopia** Piaget

1880 — *Boopia,* Piaget, Les Pédiculines, pags. 599-600.
1908 — *Boopia,* Kellogg, Genera Insectorum, fasc. 66, Mallophaga, pags. 75.
1916 — *Boopia,* Harrison & Johnston, Parasitology, vol. 8, pags. 345-347.

DIAGNOSE: —

Tête large, retrécie et limitée en avant par un petit bord arrondi et plus ou moins concave à l'occiput. Sur les côtés, les bords presentent un sillon, étroit et profond en avant des yeux et en arrière de ceux-ci une grande échancrure donnant aux tempes une forte saillie latérale. Pas d'appendices aigus, fortement chitinisés, tournés en arrière et provenant de la cuticule tégumentaire épaissie à la face inférieure. Tempes bien développées; anguleuses.

Palpes maxillaires de 4 articles.

Deux forts piquants sur la face supérieure du mesothorax, entourés d'une bande foncé.

Abdomen large, ovale, le plus souvent blanchâtre, mais pouvant présenter une bande transversale brunâtre sur les tergites. Sur chaque face, des soies souples formant une ou deux rangées transversales sur les tergites et sternites. A la face dorsale, ces mêmes soies se disposent en 8 séries longitudinales: 4 submédianes et 4 submarginales; pas de séries submarginales à la face ventrale.

Trois paires de poils sensitifs sur les trois premiers anneaux de l'abdomen, près des bords.

Six paires de stigmates, placés sur les pleurites abdominaux.

ESPECE TYPE: — *Boopia tarsata* Piaget.

TABLE DES ESPECES

1	Une rangée transversale de soies sur les sternites abdominaux	2
1'	Deux rangées transversales sur les mêmes sternites	5
2 (1)	Appendices postérieurs de l'abdomen de la femelle avec une soie subterminale, mince et souple	3
2'	Les mêmes appendices avec un poil terminal, fort et raide comme une épine	4
3 (2)	Des piquants et des soies sur les bords latéraux du pro-	

	thorax. Vesicula pennis avec des pièces semblables à celles de la fig. 7	*B. tarsata*
3'	Rien que des soies sur les bords latéraux du prothorax. Vesicula penis avec des pièces semblables à celles de la fig. 9	*B. dubia*
4 (2')	Soie oculaire mince et souple. Les bords de l'échancrure latérale de la tête ont une encoche derrière les yeux	*B. mjöbergi*
4'	Soie oculaire forte et raide comme une épine. Les bords de l'échancrure latérale de la tête sont unis	*B. phanerocerata* *B. bettongia*
5 (1')	Le bord occipital pourvu d'épines	6
5'	Le bord occipital sans épines	7
6 (5)	Des piquants aux extremités de la bande transversale, à la face supérieure du prothorax	*B. spinosa*
6'	Des soies souples aux mêmes points	*B. grandis*
7 (5')	Des épines près du bord postérieur du metathorax	*B. uncinata*
7'	Pas d'épines près du bord postérieur du metathorax	*B. nota-fusca* *B. minuta*

Boopia tarsata Piaget

1880 — *Boopia tarsata,* Piaget, Les Pédiculines, pags. 599-600.
1880 — *Boopia longitarsata,* Piaget, Les Pédiculines, Atlas, pl. 50, fig. 1.
1908 — *Boopia tarsata,* Kellogg, Genera Insectorum, fasc. 66, Mallophaga, pags. 75, pl. 3, fig. 25.
1913 — *Boopia tarsata,* Johnston & Harrison, Proceedings of the Royal Society of Queensland, vol. 24, pags. 14.
1916 — *Boopia tarsata,* Cummings, Proceedings of the Zoological Society of London, pags. 269-271, fig. 9.
1916 — *Boopia tarsata,* Harrison, Parasitology, vol. 9, pags. 30.
1939 — *Boopia tarsata,* Thompson, Annals and Magazine of Natural History, Ser. 11, vol. 3, pags. 604.

HÔTE-TYPE: — *Vombatus ursinus* Shaw (= *Phascolomys fossor*).

HÔTES SECONDAIRES: — Cummings enregistra l'existence de ce parasite sur *Vombatus hirsutus* Perry (= *Phascolomys mitchelli* Owen).

Specimens examines: —

1) Plusieurs mâles et femelles trouvés sur *Vombatus ursinus* au jardin zoologique de Melbourne et à celui de Sydney.
2) De nombreux mâles et femelles pris sur *Vombatus hirsutus*, originaire de Tasmanie et appartenant au jardin zoologique de Londres. Ces spécimens furent comparés par un de nous (G. B. T.) aux types existant au Musée Britannique.
3) Une femelle provenant de *Wallabia bicolor*, de Victoria, Australie collectionnée par A. S. Le Souëf. Quoique nous soyons convaincus de l'exactitude de cette détermination, nous ne saurions pas l'assurer en absence d'un mâle.

Description: — Femelle (fig. 1). Longueur: 2.92 mm.

La tête (fig. 3) a l'aspect général commun à toutes les espèces du même

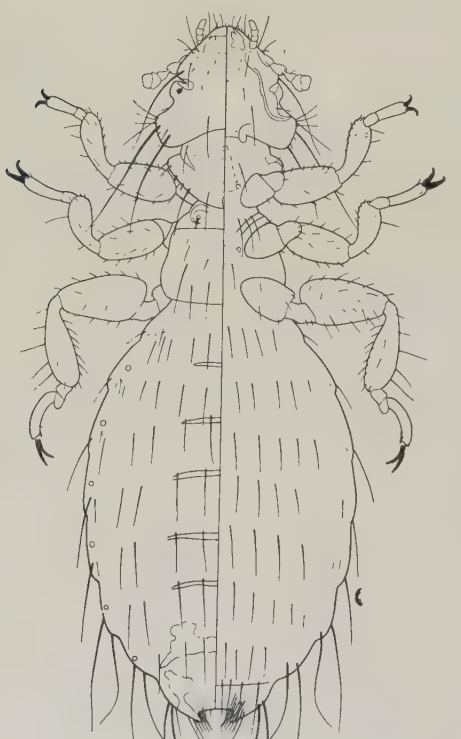


Fig. 1 — *Boopia tarsata*, femelle.

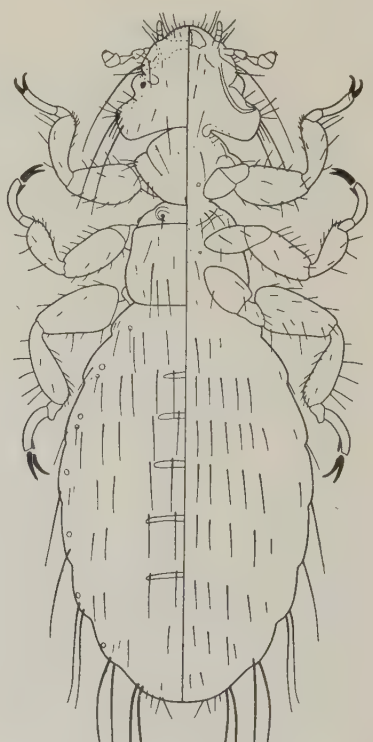


Fig. 2 — *Boopia tarsata*, mâle.

genre. On doit remarquer seulement l'absence sur les bords de l'échancrure latérale et derrière les yeux d'un angle rentrant semblable à ceux existant en avant de ces organes, comme, par exemple, chez *B. nota-fusca*. La comparaison des dessins relatifs à ces deux espèces (figs. 3 et 22) fera connaître cette particularité mieux que n'importe quelle description. Tempes saillantes et bien développées, bi-angulaires, légèrement regetées en arrière par suite de la forte concavité du bord occipital.

A la face supérieure de la tête les poils sont très courts et minces. Parmi les marginaux se trouvent de longues soies: sur le bord antérieur, près de l'angle antérieur du sillon préoculaire et sur les tempes. Soie oculaire relativement grande, mince et souple. Le bord occipital ne porte qu'une seule paire de grands poils et pas d'épines.

De chaque côté du prothorax on trouve des soies et des piquants périphériques: tout près des angles latéraux existent deux soies, suivies de deux piquants et, sur le bord postérieur deux grandes soies. Sur sa face supérieure il n'existe qu'une paire de soies, aux extrémités de la bande transversale de tegument épaissi (fig. 4).

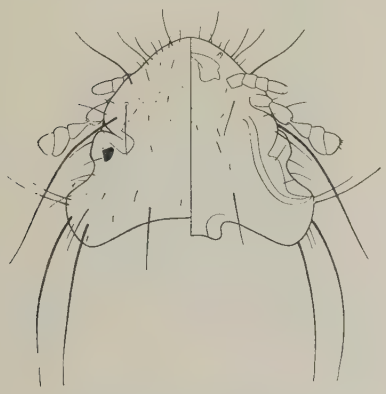


Fig. 3 — *Boopia tarsata*, tête.

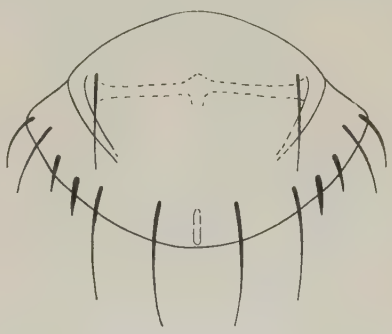


Fig. 4 — *Boopia tarsata*, prothorax.

Les pattes n'ont rien de particulier.

Abdomen avec une seule série transversale de poils longs sur chaque face des segments typiques, ayant aux extrémités des soies beaucoup plus longues formant la bordure périphérique de cette partie du corps. A sa face dorsale, cinq bandes brunâtres, dont la première se trouve au niveau des stigmates antérieurs et la dernière au niveau de ceux de la cinquième paire. En arrière de ces bandes, on trouve deux taches foncées sur la même face et près de l'extrémité postérieure de l'abdomen, d'une forme particulière comme on peut le voir à la fig.

Région génitale (fig. 5). Les gonopodes sont petits, frangés de poils, placés en dessous des appendices postérieurs de l'abdomen. Ceux-ci portent une petite soie subterminale, mince et souple, sur les bords postérieurs et pas d'épines terminales.

Mâle (fig. 2). Longeur: 2.79 mm.

Presque semblable à la femelle, dont il diffère, cependant, par l'abdomen plus petit et surtout plus étroit.

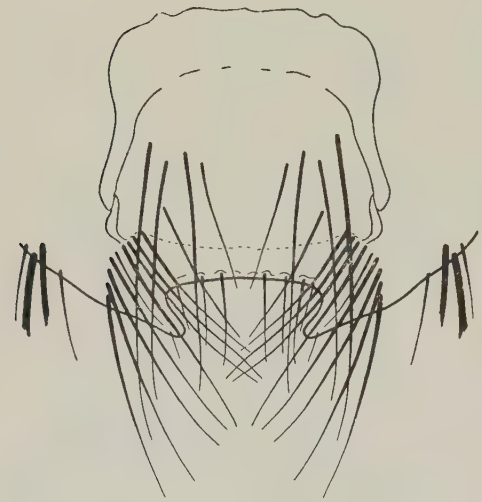


Fig. 5 — *Boopia tarsata*, région génitale de la femelle.

Fig. 6 — *Boopia tarsata*, armature génitale du mâle.

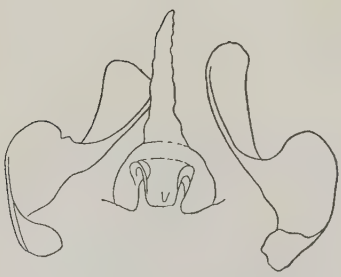


Fig. 7 — *Boopia tarsata*, pièces chitineuses de la vésicule péniène (Aspect dorsal).

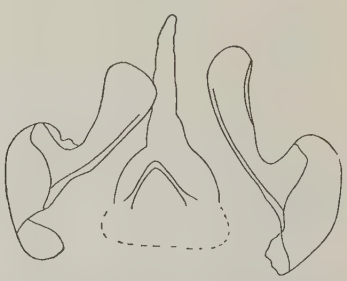


Fig. 8 — *Boopia tarsata*, pièces chitineuses de la vésicule péniène (Aspect ventral).

L'armature genitale (fig. 6) appartient au type commun à toutes les espèces de la même famille, mais elle possède sur la vesicula penis deux grandes pièces chitinisées de forme particulière (figs. 7-8).

Boopia dubia n. sp.

HÔTE-TYPE: — *Lasiorhinus latifrons* Owens, de Blanchetown, Australie Méridionale.

SPECIMENS EXAMINES: — Six femelles et douze mâles provenant de l'hôte et de la localité typiques. Ces exemplaires, qui ont servi à la description de l'espèce, appartiennent tous à la collection G. B. Thompson.

DESCRIPTION: — Femelle. Longueur: 2.69 mm. Mâle. Longueur: 2.85 mm.

Cette espèce est presque semblable à *B. tarsata*, que nous venons d'étudier. Elle s'en distingue cependant non seulement par la forme des pièces de la vésicula penis, mais encore par d'autres particularités de moindre valeur.

Le premier de ces caractères ne peut laisser aucun doute à ce sujet: il y a, en effet, dans le mesosome, de chaque côté du penis, des grandes pièces chitinisées dont la forme est nettement différente de celles trouvées chez *tarsata*, comme on peut s'en rendre compte par la comparaison des dessins publiés

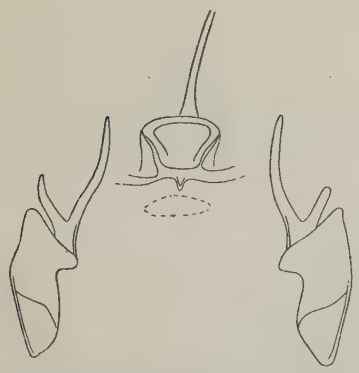


Fig. 9 — *Boopia dubia*, pièces chitineuses de la vésicule pénième (Aspect dorsal).

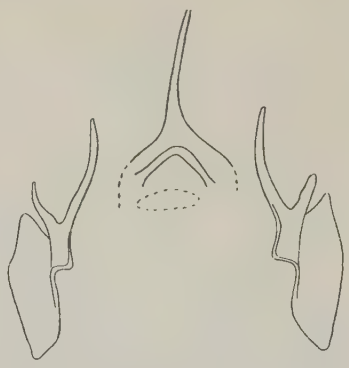


Fig. 10 — *Boopia dubia*, pièces chitineuses de la vésicule pénième (Aspect ventral).

dans ce travail (figs. 9 et 10). Un examen attentif nous permet d'affirmer que ces différences ne peuvent pas être imputées à des déformations accidentelles subies par les exemplaires.

En dehors de ce caractère fondamental, on doit faire attention:

— aux poils de la face supérieure de la tête, très longs par rapport à ceux de *tarsata* (fig. 11).

— à l'absence d'épines sur les bords latéraux du prothorax (fig. 12).

— à l'absence de bandes foncées sur les tergites abdominaux de la femelle, entièrement blanchâtres, ce qui peut, d'ailleurs, provenir d'une décoloration de nos spécimens.

— au plus grand nombre de soies sur le tiers postérieur de la face ventrale de l'abdomen.

Fig. 11 — *Boopia dubia,* tête.

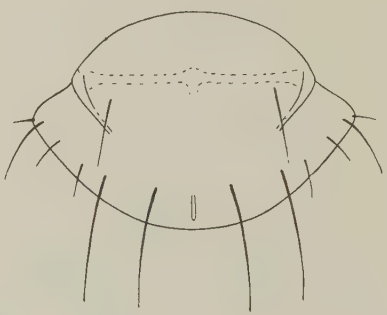


Fig. 12 — *Boopia dubia,* prothorax.

Ces différences, quoique petites, n'en sont pas moins nettes et constantes.

Type: — Un mâle.

Boopia grandis Piaget

1885 — *Boopia grandis,* Piaget, Les Pédiculines, Supplément, pgs. 154-155, pl. 16, fig. 8.
1908 — *Boopia grandis,* Kellogg, Genera Insectorum, fasc. 66, Mallophaga, pags. 75.
1910 — *Boopia peregrina,* Mjöberg, Arkiv för Zoologi, vol. 6, n.º 13, pags. 21-26, 240-241, figs. 10-18, 131, pl. 4, fig. 9.
1913 — *Boopia grandis,* Johnston & Harrison, Proceedings of the Royal Society of Queensland, vol. 24, pags. 13.
1916 — *Boopia grandis,* Harrison, Parasitology, vol. 9, pags. 29.
1916 — *Boopia peregrina,* Harrison, Parasitology, vol. 9, pags. 30.
1939 — *Boopia grandis,* Thompson, Annals and Magazine of Natural History, ser. 11, vol. 3, pags. 603.
1939 — *Boopia peregrina,* Thompson, Annals and Magazine of Natural History, ser. 11, vol. 3, pags. 605.

Hôte-type: — *Megaleia rufa* Desmarest (= *Macropus rufus*), du jardin zoologique de Rotterdam.

Hôtes secondaires: — Ce parasite a été décrit par Mjöberg comme

espèce nouvelle qu'il appela *B. peregrina* d'après plusieurs spécimens qui auraient été pris sur *Lutra pruneri*, originaire de l'Inde. Mais il s'agit certainement d'un fait accidentel, sinon d'une erreur d'étiquetage, et on ne doit pas considérer cette loutre comme un hôte normal de l'espèce.

Specimens examines: —

1) Une préparation, avec une femelle et un jeune, de la collection Piaget, appartenant au Musée Britannique, etiquetée: *Boopia grandis* P., Sur un *Macropus rufus*. Les exemplaires, qui furent traités par l'hydroxyde de potassium et remontés, sont des cotypes de l'espèce.

2) Une femelle et deux mâles pris sur *Megaleia rufa* du jardin zoologique de Sydney, Nouvelle-Galles du Sud, et deux femelles provenant du même hôte, sans indication d'origine.

3) Un grand nombre de mâles, femelles et jeunes, provenant de *Macropus* sp. de Brocken Hill, Nouvelle-Galles du Sud, reçus R. N. McCullock.

4) Deux préparations, avec deux femelles, appartenant à la collection G. B. Thompson, etiquetées: *Boopia peregrina* Mjöberg, Cotype *Lutra pruneri*, India, Riksmuseets Ent. Afdelning.

5) Deux femelles provenant de *Macropus major*, de Coonamble, Nouvelle-Galles du Sud.

Description: — Femelle (fig. 13). Longueur: 2.68 mm.

La tête (fig. 14) a l'aspect général des espèces que nous venons de décrire, mais elle s'en distingue par un sillon, profond et étroit, situé derrière les yeux, sur les bords de l'échancrure latérale. Ce sillon, quoique plus petit, est semblable à ceux existant en avant de ces organes chez tous les Boopidés et, comme ceux-ci est doublé d'une bande légèrement foncée. Les tempes sont moins larges et moins saillantes que celles de *tarsata*.

De même que sur cette espèce, les poils de la face supérieure sont courts et peu nombreux; la soie oculaire cependant est sensiblement plus forte, comme un petit piquant. Sur le bord occipital il y a une paire de longues soies et une autre de grandes épines, la première se trouvant plus rapprochée du milieu. Les soies de la face ventrale sont beaucoup plus grandes que celles de *tarsata*.

Les palpes, grêles, portent à la face supérieure du dernier article les organes sensitifs répresentés fig. 15.

Poils et piquants périphériques du prothorax (fig. 16) dans le même ordre que ceux de *tarsata,* mais le premier poil beaucoup plus court. Sur la face supérieure de ce même segment thoracique existent deux paires de soies, au lieu d'une seule, et, près du bord postérieur du metathorax, une paire de petites épines.

Fig. 13 — *Boopia grandis,* femelle.

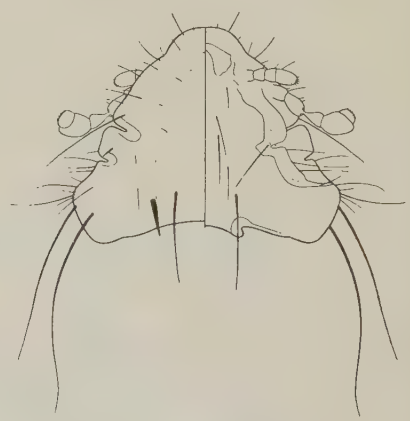


Fig. 14 — *Boopia grandis,* tête.

Pattes sans aucune particularité.

Abdomen grand, ovale, membraneux, avec sur les tergites des segments typiques des bandes transversales dont la couleur est plus foncée vers la région mediane. Les derniers anneaux ont une pigmentation plus étendue, formant des taches d'une forme particulière (fig. 17). Pleurites peu colorés, jaunâtres.

A la face supérieure de l'abdomen, la chaetotaxie est, à peu près, pareille à celle de *tarsata;* elle en diffère, cependant, à la face ventrale où chaque sternite porte deux series transversales de soies: l'antérieure formée de soies courtes et la postérieure composée de soies plus longues et plus nombreuses.

Région génitale (fig. 17) avec deux petits gonopodes bordés de soies, dont la longueur s'accroît de dedans en dehors, et recouverts par les appendices

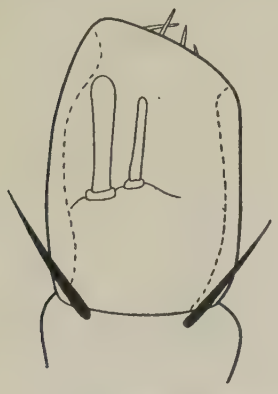


Fig. 15 — *Boopia grandis,* dernier article des palpes maxillaires.

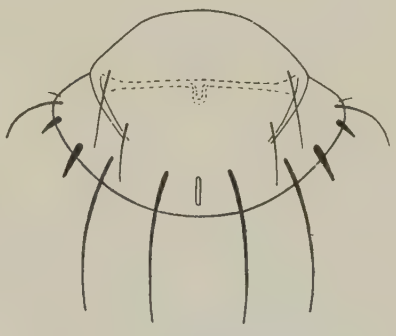


Fig 16 — *Boopia grandis,* prothorax.

postérieurs de l'abdomen. Ceux-ci ont une grande épine terminale, une série de poils courts sur le bord interne et, à l'origine du bord externe, une saillie latérale portant de longues soies.

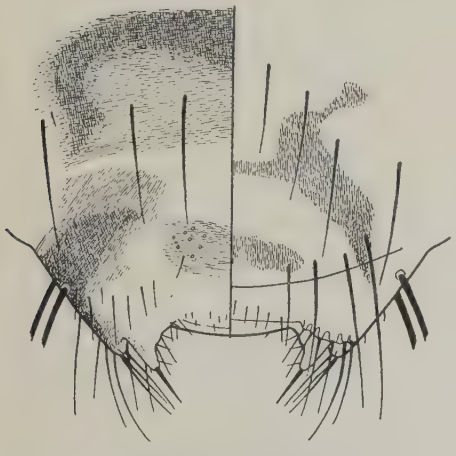


Fig. 17 — *Boopia grandis,* extrémité postérieure de l'abdomen de la femelle.

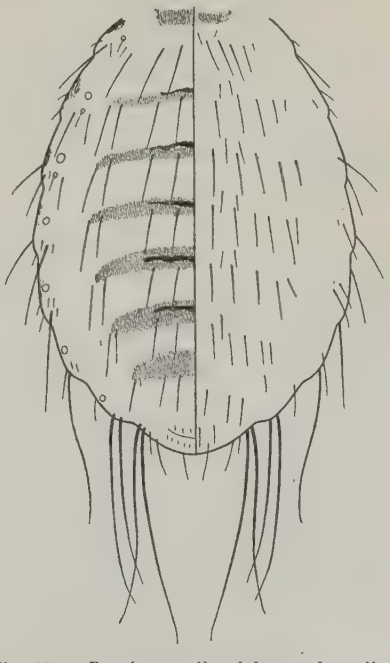


Fig. 18 — *Bcopia grandis,* abdomen du mâle.

Mâle. Longueur: 2.25 mm.

Le mâle se distingue de la femelle par son abdomen plus court, plus

mince, à l'extrémité postérieure arrondie, avec un plus grand nombre de soies terminales (fig. 18).

Fig. 19 — *Boopia grandis,* armature génitale du mâle.

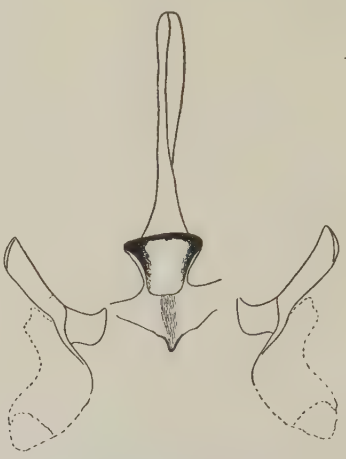


Fig. 20 — *Boopia grandis,* pièces chitinisées de la vésicule pénième.

Armature génitale (fig. 19) semblable à toutes les autres de la même famille, mais avec dans le mesosome des grandes pièces chitinisées d'une forme caracteristique (fig. 20).

Boopia nota-fusca Le Souëf

1902 — *Boopia nota-fusca,* Le Souëf, Victorian Naturalist, vol. 19, pags. 50, fig. 1.
1908 — *Boopia nota-fusca,* Kellogg, Genera Insectorum, fasc. 66, Mallophaga, pags. 75.
1913 — *Boopia nota-fusca,* Johnston & Harrison, Proceedings of the Royal Society of Queensland, vol. 24, pags. 13.
1916 — *Boopia nota-fusca,* Harrison & Johnston, Parasitology, vol. 8, pags. 347-349, figs. 5-6.
1916 — *Boopia nota-fusca,* Harrison, Parasitology, vol. 9, pags. 30.
1939 — *Boopia nota-fusca,* Thompson, Annals and Magazine of Natural History, Ser. 11, vol. 3, pags. 604.

Hôte-type: — *Wallabia bicolor* Desmarest (= *Macropus ualabatus*).

Hôtes secondaires: — D'après Harrison & Johnston ce parasite se trouverait aussi chez *Macropus giganteus*, fait qui aurait besoin d'être

vérifié de nouveau car il est problable que ces auteurs ne se sont pas aperçus des différences de chaetotaxie existant entre cette espèce et *Boopia mjöbergi*, puisque leur dessin de *nota-fusca* n'a qu'une série transversale de soies sur les tergites abdominaux. En plus, tout porte à croire que *Macropus giganteus* est la même espèce que *Macropus major* Shaw, hôte type de *mjöbergi*.

Specimens examines: —

1) Deux femelles, un mâle et trois jeunes, pris en 1902 sur *Wallabia bicolor*, de Victoria, Australie, ayant appartenu à la collection le Souëf. Ces spécimens, que se trouvent à present dans la collection G. B. Thompson, sont des cotypes de l'espèce.

2) Plusieurs femelles, mâles et jeunes, de la collection du Musée Britannique, provenant d'un « Wallaby », de Daryo, Victoria, Australie, collectionnés par Bruno Deck, le 15-VI-1911.

3) Trois femelles, provenant de *Osphranter robustus,* de Belltree, Nouvelle-Galles du Sud, collectionnés par L. Harrison. En l'absence de mâles, l'identification de ces parasites ne peut pas être admise d'une façon absolument rigoureuse, quoique on ne connaisse pas deux espèces de ce genre ayant des femelles tout à fait pareilles.

Description: — Femelle (fig. 21). Longueur: 2.06 mm.

Cette espèce est sensiblement plus petite et moins colorée que les précédentes. Sa tête (fig. 22) à la même forme générale commune à toutes les espèces du genre *Boopia,* avec les tempes saillantes en dehors et en arrière, pas autant que chez *tarsata* mais un peu plus que chez grandis. A ce point de vue, *nota-fusca* représente une forme intermediaire entre ces deux espèces. Sur les bords de l'échancrure latérale existe en arrière des yeux, un sillon doublé d'une bande légèrement foncée, qui quoique plus petit que celui de *grandis* n'en est pas moins net. A la face supérieure un nombre relativement élevé de poils longs, comme ceux de *dubia,* et près du bord occipital une seule paire de longues soies. Soie oculaire grande, mince et souple.

Thorax dépourvu de piquants sur les bords latéraux du prothorax, ainsi que sur le postérieur du metathorax; ces piquants sont remplacés par des soies délicates et souples, tel que chez *dubia.* Mais, au contraire de ce qui se passe dans cette espèce, on trouve deux paires de soies sur la face supérieure du premier segment thoracique (fig. 23).

Abdomen (fig. 24) grand, ovale, avec deux séries transversales de soies sur les tergites et sternites des segments typiques; l'antérieure composée de soies plus courtes. Sur quelques spécimens les poils des deux séries sont très rapprochés, formant presque une rangée unique, mais pouvant être toujours distinguées non seulement par le petit espace qui les separent, comme par les dimensions de leurs soies.

Fig. 21 — *Boopia nota-fusca*, femelle.

Fig. 22 — *Boopia nota-fusca*, tête.

A la face supérieure de l'abdomen existent cinq bandes transversales jaunâtres au niveau des cinq premières paires de stigmates; une autre au niveau de la sixième paire, est plus large et porte deux soies antérieures et quatre composant une série postérieure. Cette particularité ne se retrouve dans aucune des espèces antérieurement étudiées dans ce travail. Sur la face ventrale, près de l'extremité postérieure de l'abdomen: une bande légèrement colorée avec deux branches longitudinales et transversalement allongée à sa partie médiane.

Région génitale (fig. 25) à peu près semblable à celle des autres espèces

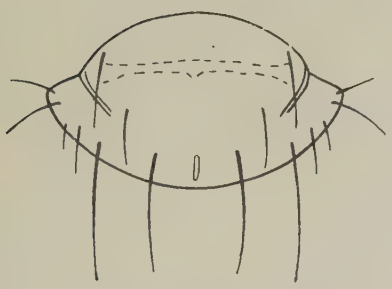


Fig. 23 — *Boopia nota-fusca,* prothorax.

Fig. 24 — *Boopia nota-fusca,* abdomen de la femelle.

Fig. 25 — *Boopia nota-fusca,* extrémité postérieure de l'abdomen de la femelle.

Fig. 26 — *Boopia nota-fusca,* armatura génitale du mâle.

du même genre, ayant une épine terminale sur les appendices postérieurs de l'abdomen.

Mâle. Longueur: 1.77 mm.

Presque semblable à la femelle, mais possedant un caractère sexuel secondaire: une paire de forts piquants sur les femurs medians, à l'extrémité proximale des bords inférieurs.

Armature génitale (fig. 26) ayant l'aspect commun aux espèces du même genre. Il nous a été impossible d'étudier convenablement, sur nos spécimens, les pièces chitinisées de la vésicule penienne. Nous croyons, cependant, qu'elles ont une forme particulière et caractéristique.

Boopia minuta Le Souëf

1902 — *Boopia minuta,* Le Souëf, Victorian Naturalist, vol. 19, pags. 51, fig. 3.
1908 — *Boopia minuta,* Kellogg, Genera Insectorum, fasc. 66, Mallophaga, pags. 75.
1913 — *Boopia minuta,* Johnston & Harrison, Proceedings of the Royal Society of Queensland, vol. 24, pags. 13.
1916 — *Boopia minuta,* Harrison, Parasitology, vol. 9, pags. 30.
1939 — *Boopia minuta,* Thompson, Annals and Magazine of Natural History, Ser. 11, vol. 3, pags. 604.

Hôte-type: — *Wallabia dorsalis* Gray (= *Macropus dorsalis*).

Specimens examines: — Une femelle, appartenant au Musée Britannique, étiquetée: « *Boopia minuta* Le Souëf, 1902-173, Paratype, *Macropus dorsalis*, Victoria, 1902 ».

Note: — L'exemplaire examiné est semblable dans ses moindres détails aux femelles de *Boopia nota-fusca.* Il est possible, et c'est notre conviction, que les deux espèces soient identiques, mais nous ne pouvons l'affirmer sans connaître le mâle de *minuta.*

Le spécimen du Musée Britannique mesure 1,41 mm. de longueur mais ce chiffre ne peut être comparé à celui que nous assignons à *nota-fusca*, se rapportant à du matériel non traité par l'hydroxyde de potassium, comme l'a été celui de *nota-fusca.*

Boopia mjöbergi n. sp.

Hôte-type: — *Macropus major* Shaw, de Victoria, Australie.

Specimens examines: — Ceux qui ont servi à la description de l'espèce: trois femelles et un jeune, provenant de l'hôte et de la localité typiques.

DESCRIPTION: — Femelle. Longueur: 1.57 mm.

Cette espèce se rapproche beaucoup de *Boopia nota-fusca* et n'en diffère que par la chaetotaxie abdominale. Les tergites et sternites n'ont qu'une série transversale de soies, comme dans *bettongia* (fig. 27).

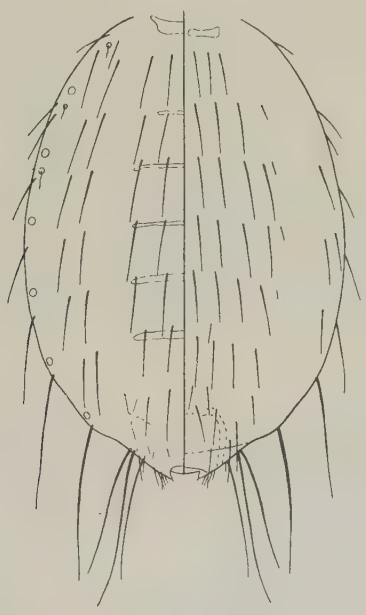


Fig. 27 — *Boopia mjöbergi,* abdomen de la femelle.

NOTE: — Les spécimens ayant servi à la description de cette espèce ont appartenu à la collection Le Souëf et se trouvent à présent dans la collection G. B. Thompson. Il s'agît, problablement de ceux que Harrison & Johnston ont déterminé comme *nota-fusca*, provenant de *Macropus giganteus*. Dans ce cas ils auraient servi pour le dessin publié par ces auteurs, où il n'y a qu'un rang de poils sur chaque tergite abdominal.

Nous pensons que l'étude attentif de l'armature génitale du mâle, qui nous est inconnu, permettra de trouver des caractères différentiels plus tranchés entre cette espèce et *nota-fusca*.

Boopia phanerocerata Harrison & Johnston

1916 — *Boopia phanerocerata,* Harrison & Johnston, Parasitology, vol. 8, pags. 348-349, fig. 7.
1916 — *Boopia phanerocerata,* Harrison, Parasitology, vol. 9, pags. 30.
1939 — *Boopia phanerocerata,* Thompson, Annals and Magazine of Natural History, Ser. 11, vol. 3, pags. 604.

Hôte-type: — *Perameles nasuta* Geoffroy, de Woollmooloo, Sydney, Australie.

Specimens examines: —

1) Cinq femelles et deux mâles, cotypes, provenant de *Perameles nasuta* et appartenant à la collection G. B. Thompson.

2) Un mâle, pris sur le même hôte, de la Nouvelle-Galles du Sud.

3) Deux femelles appartenant aux collections du Musée Britannique, provenant aussi de *Perameles nasuta,* de Mackay, Queensland, colligées par R. E. Turner et déterminées par L. H. (Launcelot Harrisson ?).

Description: - Femelle (fig. 26). Longueur: 1.78 mm.

L'aspect général de la tête (fig. 29) n'a rien de particulier, car il est

Fig. 28 — *Boopia phanerocerata,* femelle.

Fig. 29 — *Boopia phanerocerata,* tête.

à peu près pareil dans toutes les espèces du même genre. Bords de l'échancrure latérale unis, sans aucun sillon derrière les yeux, comme chez *grandis* et *nota-fusca*. A la face tergale, la chaetotaxie rappele celle de la dernière de ces espèces; les poils sont cependant plus petits et moins nombreux. Ceux qui se trouvent un peu en dedans et au niveau des lobes préoculaires, sont particulièrement courts formant deux paires de forts piquants, dont les plus longs appartienent à la paire externe. Près du bord occipital il n'y a qu'une paire de grandes soies, mais pas aussi longues et bien plus fortes que chez *nota-fusca*. Les soies oculaires sont aussi plus courtes et plus grosses, de vraies épines.

Sur les bords et à la face supérieure du prothorax existent des soies et des piquants se rapprochant de ceux de *tarsata* par leur nombre et leur distribution. La première soie est, cependant, beaucoup plus courte, comme il arrive, par exemple, chez *grandis*. Il y a en plus, chez *phanerocerata*, une paire de petites soies, après les dernières épines periphériques, qui n'a pas de correspondante dans aucune des espèces que nous venons d'étudier (fig. 30). Le metathorax porte des soies plus au moins longues, mais pas de piquants près de son bord postérieur.

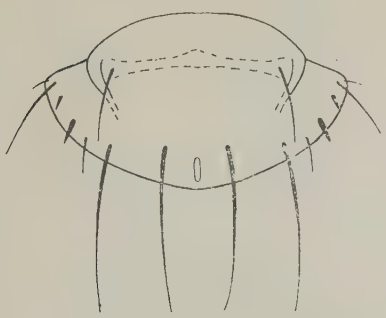


Fig. 30 — *Boopia phanerocerata*, prothorax.

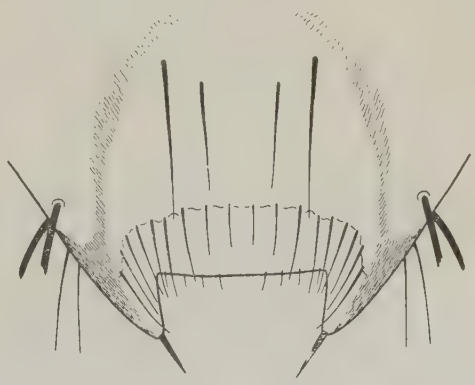


Fig. 31 — *Boopia phanerocerata*, région génitale de la femelle.

Abdomen grand, ovoïde, avec une série transversale de soies sur les tergites et sternites des segments typiques et presque entièrement blanchâtre. Sur nos spécimens, peut être décolorés, il n'y avait qu'une legère pigmentation à l'extrémité postérieure. Les soies de l'abdomen forment aussi des rangées longitudinales. Celles de la face inférieure se reunissent dans la région médiane; les autres se divisent en trois groupes: un groupe médian composé de quatre séries et deux latéraux de deux séries chacun.

Région génitale (fig. 31) avec deux gonopodes bordés de soies, moins nombreuses cependant que chez les espèces antérieurement décrites dans ce travail, et recouverts par les appendices terminaux de l'abdomen, dont l'extré mité porte une forte épine.

Mâle. Longueur: 1.74 mm.

Presque pareil à la femelle, ayant un seul caractère sexuel secondaire, constitué par une paire d'épines sur les bords inférieurs des fémurs médians, près de leurs extrémités proximales (fig. 32).

Armature génitale (fig. 33) du type commun à toutes les espèces de la même famille.

Fig. 32 — *Boopia phanerocerata,* patte médiane du mâle.

Fig. 34 — *Boopia phanerocerata,* pièce chitinisée de la vésicule péniène.

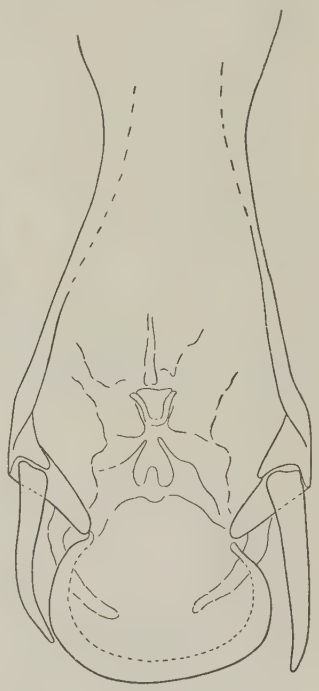


Fig. 33 — *Boopia phanerocerata,* armature génitale du mâle.

Il nous a été impossible d'étudier convenablement sur nos spécimens les formations chitineuses de la vésicule péniène. Nous devons, cependant, attirer l'attention sur une pièce médiane, représentée fig. 34 et résultant probablement de la fusion des pièces latérales, qui n'existe chez aucune des espèces que nous venons de décrire.

Boopia bettongia Le Souëf

1902 — *Boopia bettongia,* Le Souëf, Victorian Naturalist, vol. 19, pags. 50, fig. 2.
1908 — *Boopia bettongia,* Kellogg, Genera Insectorum, fasc. 66, Mallophaga, pags. 75.
1913 — *Boopia bettongia,* Johnston & Harrison, Proceedings of the Royal Society of Queensland, vol. 24, pags. 14.
1916 — *Boopia bettongia,* Harrison, Parasitology, vol. 9, pags. 29.
1939 — *Boopia bettongia,* Thompson, Annals and Magazine of Natural History, Ser. 11, vol. 3, pags. 603.

Hôte-type: — *Aepyprymnus rufescens* Gray (= *Bettongia rufescens*).

Specimens examines: — Une femelle, paratype, appartenant à la collection du Musée Britannique.

Note: — La femelle que nous avons pu examiner est identique à celles de *phanerocerata*, dans ses moindres détails. Nous croyons même que *phanerocerata*, et *bettongia* sont des synonymes et, dans ce cas, ce dernier nom, doit prévaloir par droit de priorité. Nous attendons, cependant, l'occasion d'examiner l'unique mâle de *bettongia* existant dans la collection du Musée Britannique, pour prendre une décision définitive à ce sujet.

Boopia uncinata Harrison & Johnston

1916 — *Boopia uncinata,* Harrison & Johnston, Parasitology, vol. 8, pags. 349-350, fig. 8.
1916 — *Boopia uncinata,* Harrison, Parasitology, vol. 9, pags. 30.
1939 — *Boopia uncinata,* Thompson, Annals and Magazine of Natural History, Ser. 11, vol. 3, pags. 604-608, fig.

Hôte-type: — *Dasyurus quoll* Zimmermann (= *Dasyurus maculatus*), de Sydney, Australie.

Specimens examines: —

1) Deux femelles, un mâle et un jeune, provenant de *Dasyurus quoll*, de Sydney, Nouvelle-Galles du Sud, Australie.
2) Cinq femelles et six mâles, provenant de *Dasyurinus geoffroyi,* de Forest Grove, S. W. Australia. Parmi ces spécimens se trouve le mâle, allotype, décrit par un de nous (G. B. T.).

Description: — Femelle (fig. 35). Longueur: 1.82 mm.

La tête (fig. 36) a l'aspect général commun à toutes les espèces du genre *Boopia,* mais se rapproche davantage de celles de *bettongia* et *phanerocerata,* par le rapport de ses dimensions et par la forme de sa moitié postérieure. Pas des sillons nets sur les bords de l'échancrure latérale, derrière les yeux, tel que ceux de *grandis* et *nota-fusca,* quoique les lobes oculaires soient légèrement saillants. Tempes larges, plus saillantes que chez *phanerocerata,* et, comme dans cette espèce, un peu rejetées en arrière.

La face supérieure ne porte qu'un nombre restreint de poils courts vers son milieu. Sur le lobe preoculaire une grande soie et trois épines, dont la plus grande se trouve plus rapprochée de l'axe médian; près des angles temporaux, outre quelques petits poils, deux grandes soies dont la postérieure est considérablement plus longue; finalement, sur le bord occipital, une série de

quatre soies, les plus grandes et plus grosses composant la paire externe. Soie oculaire comme un piquant, très court et fort.

Sur la face inférieure, les soies se rangent longitudinalement, formant deux séries, une de chaque côté de la ligne mediane.

Fig. 35 — *Boopia uncinata*. femelle.

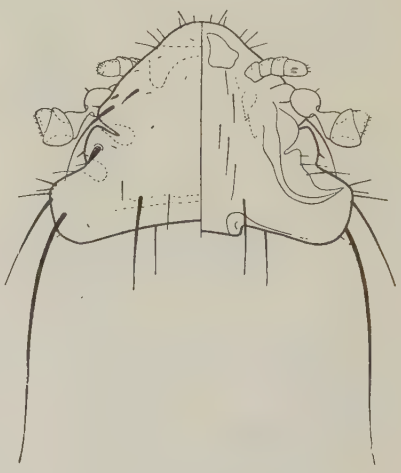


Fig. 36 — *Boopia uncinata*, tête.

Prothorax avec trois épines sur chaque bord latéral: les deux premières petites et rapprochées, la dernière plus grande et plus éloignée. A la face supérieure, aux extrémités de la bande transversale jaunâtre, une paire de piquants dont la longueur peut varier un peu, mais qui garde toujours l'aspect représenté dans la fig. 37. L'existence de piquants sur les angles latéraux et à la face supérieure du prothorax, remplaçant les soies qui s'y trouvent d'habitude, distingue nettement ce segment thoracique de ceux des espèces antérieurement décrites dans ce travail.

A la face supérieure du metathorax, une paire d'épines antérieure et une autre postérieure, près du bord distal de ce segment.

Abdomen grand, large, et presque entièrement blanchâtre, ce qui provient peut-être d'une décoloration subie par nos spécimens, car les derniers tergites ont une tâche à peine visible (fig. 35). Sur la face supérieure, une série

transversale de soies sur chaque tergite et huit séries longitudinales formées par ces mêmes soies: quatre submédianes et quatre submarginales. A la face inférieure, deux rangées transversales sur chaque segment abdominal: une antérieure composée de poils courts et une autre postérieure de soies plus longues.

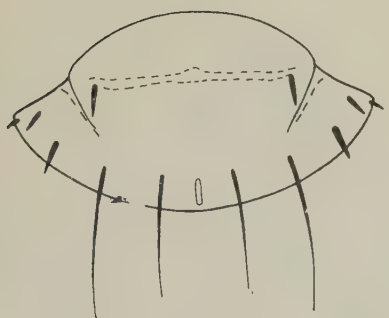


Fig. 37 — *Boopia uncinata,* prothorax.

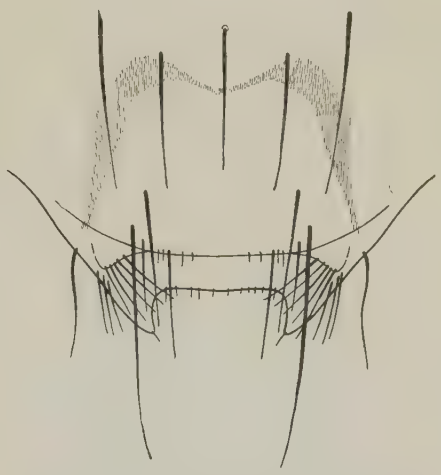


Fig. 38 — *Boopia uncinata,* région génitale de la femelle.

Région génitale (fig. 38) à peu près semblable à celle de toutes les espèces du même genre, mais avec une particularité; la soie terminale des appendices postérieurs de l'abdomen est courte, mince et flexible, au lieu de ressembler à une épine.

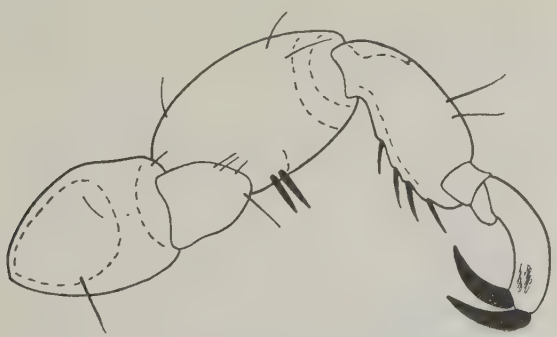


Fig. 39 — *Boopia uncinata,* patte médiane du mâle.

Mâle. Longueur: 1.61 mm.

Presque pareil à la femelle, ayant cependant comme caractère sexuel secondaire une paire de piquants sur l'extrémité proximale du bord inférieur des fémurs medians (fig. 39).

Armature génitale (fig. 40) du type général propre au genre. Il nous a été impossible d'étudier convenablement les pièces chitinisées de la vésicule pénième. Cependant, nous devons attirer l'attention sur la plaque médiane, sem-

Fig. 40 — *Boopia uncinata,* armature génitale du mâle.

Fig. 41 — *Boopia uncinata,* pièces chitinisées de ia vésicule pénième.

blable à celle de *phanerocerata* mais dépourvue de la forte saillie au milieu de l'échancrure antérieure. Comme particularité, on doit remarquer aussi les bords dentelés des pièces latérales (fig. 41).

Boopia spinosa Harrison & Johnston

1916 — *Boopia spinosa,* Harrison & Johnston, Parasitology, vol. 8, pags. 350-352, fig. 9.
1916 — *Boopia spinosa,* Harrison, Parasitology, vol. 9, pags. 30.
1939 — *Boopia spinosa,* Thompson, Annals and Magazine of Natural History, Ser. 11, vol. 3, pags. 604.

Hôte-type: — *Wallabia bicolor* Desmarest (= *Macropus ualabatus*), de Victoria, Australie.

Specimens examines: — Une femelle et un mâle, provenant de *Wallabia bicolor*, etiquetés comme types de l'espèce et appartenant à la collection G. B. Thompson.

DESCRIPTION: — Femelle (fig. 42). Longueur: 1.84 mm.

La tête (fig. 43) a l'aspect général commun aux espèces du genre *Boopia,* mais le rapport de ses dimensions est nettement différent. Bien plus courte et large, elle peut être distinguée avec facilité, même d'*uncinata* l'espèce la plus proche. Derrière les yeux, sur les bords de l'échancrure latérale, pas de sillon pouvant être comparé à ceux de *grandis* et *nota-fusca,* mais une petite encoche,

Fig. 42 — *Boopia spinosa,* femelle.

Fig. 43 — *Boopia spinosa,* tête.

à peine visible, rendant les lobes oculaires un peu proéminents. Tempes courtes, avec des angles arrondis, et faisant une legère saillie en arrière. La face supérieure entièrement nue, sauf quelques poils periphériques près du bord antérieur, en avant des palpes, et d'autres plus nombreux, sur les angles antérieurs des tempes, pourvues dans cette espèce d'une seule longue soie. Sur cette face existent: une grande épine sur les lobes préoculaires; deux paires de soies préoccipitales, la paire interne composée de soies plus courtes que celles de la paire externe; deux forts piquants près du bord occipital, plus éloignés de la ligne médiane que les longues soies préoccipitales. La façon dont les poils se disposent à la

face inférieure, n'a rien de caractéristique, puisque, comme chez toutes les espèces, la plupart forment deux groupes submédians, tandis que d'autres se trouvent sur les bords des cavités antennales. Soie oculaire forte et courte, spiniforme.

Sur les deux tiers postérieurs des bords du prothorax, de chaque côté et d'avant en arrière, quatre épines et deux grandes soies. La première épine se trouve un peu en dedans de la deuxième; celle-ci est inserée sur l'angle latéral saillant de ce segment thoracique. De même que chez *uncinata,* les soies des extrémités de la bande transversale jaunâtre de la face supérieure, sont remplacées par deux petits piquants (fig. 44). A la face supérieure du metathorax, une paire d'épines près de son bord postérieur.

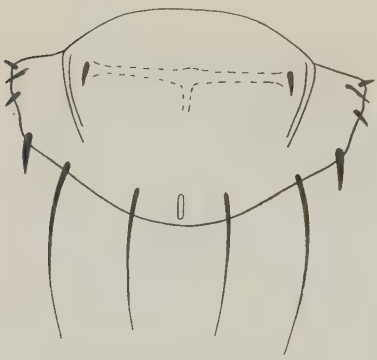


Fig. 44 — *Boopia spinosa,* prothorax.

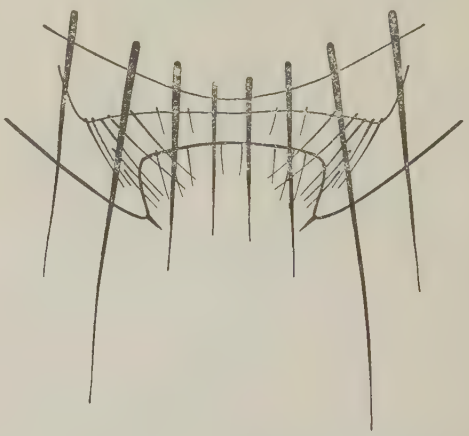


Fig. 45 — *Boopia spinosa,* région génitale de la femelle.

Abdomen grand, large, ovale, avec des bords crénelés portant des longues soies, et presque entièrement membraneux, puisque, malgré la faible coloration jaunâtre des tergites et sternites, il n'y a pas de plaques de tégument épaisi nettement délimitées. La chaetotaxie de la face supérieure est semblable à celle de plusieurs espèces du même genre: une série transversale de longues soies sur chaque segment typique et huit séries longitudinales, quatre submédianes et quatre submarginales, deux de chaque côté. A la face inférieure, deux séries transversales sur les sternites typiques, la série antérieure composée de soies courtes et la postérieure de soies plus longues.

Région génitale (fig. 45) sans aucune particularité permetant de la distinguer de toutes celles qui portent une épine terminale sur les appendices postérieurs de l'abdomen.

Mâle. Longueur: 1.71 mm.

Presque semblable à la femelle, dont il se distingue par la forme de l'extrémité postérieure de l'abdomen, comme toutes les espèces du genre *Boopia,* et par une paire d'épines à l'extrémité proximale des bords inférieurs des fémurs médians.

Armature génitale (fig. 46) du type commun aux espèces de ce genre. La chitinisation de la vésicule pénième, dont nous avons fait un simple schéma (fig. 47) n'ayant pas pu la dessiner convenablement, se rapproche de celle d'*uncinata,* et possède les mêmes particularités; une pièce médiane en forme de U et les bords des pièces latérales dentelés, quoique avec des dents plus

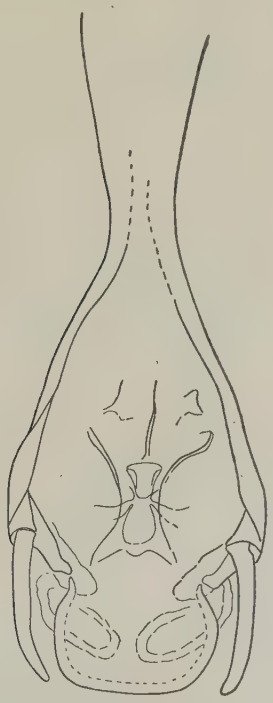


Fig. 46 — *Boopia spinosa,* armature génitale du mâle.

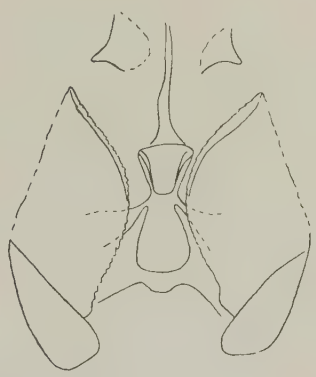


Fig. 47 — *Boopia spinosa,* pièces chitinisées de la vésicule pénième.

petites. Il nous semble, cependant, qu'il existe sur la vésicule deux formations ayant la forme d'épines de rosier avec les pointes tournées en arrière et placées de chaque côté de la grande tige médiane antérieure. Si ce caractère est exact, ce que nous ne saurions pas affirmer, il permettrait de distinguer cette espèce de toutes les autres, y compris *uncinata.*

Genre **Phacogalia** Mjöberg

1919 — *Phacogalia,* Mjöberg, Entomologisk Tidskrift, vol. 40, pgs. 95-96.

Ce genre, entrevu en 1916 par Harrison & Johnston, ne fut créé que trois ans plus tard par Mjöberg qui en donna une diagnose trop abregée et, à notre avis, tout à fait inutile. On trouve, cependant, dans la description originale de son espèce type, l'unique d'ailleurs que lui appartienne, les éléments nécessaires pour suppléer à cette insuffisance.

D'après ceux-ci, *Phacogalia* se rapprocherait de *Boopia,* dont il ne se distinguerait que par la présence, à la face ventrale de la tête, d'une paire d'épines provenant de l'épaississement de la cuticule tégumentaire et par la forme de la tête elle même.

Le premier de ces caractères se prêterait bien pour fractionner un genre dont le nombre d'espèces serait trop grand, mais il ne nous paraît pas d'ordre à imposer la creation d'un genre. Quoi qu'il en soit, il est certain que Harrison & Johnston lui ont accordé une valeur exagérée, en plaçant *Phacogalia brevispinosus* parmi les *Heterodoxus*, dont elle ne possède aucun autre caractère. Le second est encore moins net, puisque l'échancrure latérale de la tête existe, quoique plus petite. Mjöberg prétend même que les tempes sont aussi saillantes que chez *Boopia.*

A ces deux caractères, il faut en ajouter un troisième donné par ce dernier auteur: la différence de chaetotaxie dans les individus de sexes opposés. Dans le genre *Boopia* le dimorphisme sexuel est à peu près nul; nous ne pouvons pas juger de son importance chez Phacogalia, car Mjöberg ne l'a jamais fait connaître.

Espece type: — *Phacogalia brevispinosus* (Harrison & Johnston).

Phacogalia brevispinosus (Harrison & Johnston)

1916 — *Heterodoxus brevispinosus,* Harrison & Johnston, Parasitology, vol. 8, pags. 355-356, fig. 12.
1916 — *Heterodoxus brevispinosus,* Harrison, Parasitology, vol. 9, pags. 30.
1919 — *Phacogalia brevispinosus,* Mjöberg, Entomologisk Tidskrift, vol. 40, pags. 95-96.
1939 — *Phacogalia brevispinosus,* Thompson, Annals and Magazine of Natural History, Ser. 11, vol. 3, pags. 604.

Hôte-type: — *Antechinus flavipes* Waterhouse (= *Phascologale flavipes*), du Jardin Zoologique de Sydney.

N'ayant pu examiner aucun spécimen de cette espèce, il nous est impossible de rien ajouter à sa description originale, la seule publiée jusqu'à présent.

Genre **Dendrolagia** Mjöberg

1919 — *Dendrolagia,* Mjöberg, Entomologisk Tidskrift, vol. 40, pags. 94.

D'après Mjöberg, les espèces de ce genre ont l'aspect général des *Heterodoxus*, y compris la paire d'épines de la face inférieure de la tête, près des palpes. Les tempes saillantes et les particularités des

appendices postérieurs de l'abdomen les rapprochent cependant, des espèces du genre *Boopia*.

ESPECE TYPE: — *Dendrolagia pygidialis* Mjöberg.

Dendrolagia pygidialis Mjöberg

1919 — *Dendrolagia pygidialis,* Mjöberg, Entomologisk Tidskrift, vol. 40, pags. 94.
1939 — *Dendrolagia pygidialis,* Thompson, Annals and Magazine of Natural History, Ser. 11, vol. 3, pags. 605.

HÔTE TYPE: — *Dendrolagus lumholtzi* Collett, de Malanda, Queensland.

Nous ne connaissons cette espèce que par sa description originale tout à fait insuffisante.

Paraboopia n. g.

DIAGNOSE: — Boopidae avec les caractères généraux du genre *Boopia*, mais portant des palpes maxillaires de trois articles et dépourvus de poils sensitifs sur les trois premiers anneaux de l'abdomen.

ESPECE TYPE: — *Paraboopia flava* n. sp.

Paraboopia flava n. sp.

HÔTE TYPE: — *Osphranter robustus* Gould, de Scone, Nouvelle-Galles du Sud.

SPECIMENS EXAMINES: —

1) Ceux qui ont servi à la description de l'espèce: trois femelles et trois mâles, provenant de l'hôte et de la localité typiques.

2) Un mâle, recueilli sur *Osphranter robustus,* de Belltrees, Nouvelle-Galles du Sud, par L. Harrison et appartenant, comme les premiers, à la collection G. B. Thompson.

DESCRIPTION: — Femelle (fig. 48). Longueur: 1.34 mm.

La tête (fig. 49) a l'aspect général commun aux espèces du genre *Boopia*. Derrière le lobe oculaire, sur les bords de l'échancrure latérale, une petite encoche mal définie, large et peu profonde dont la forme pourrait être décrite comme intermédiaire entre celle de *B. nota-fusca* et celle de *B. spinosa*. Tempes faisant une forte saillie latérale et portant sur les angles antérieurs, où la tête a sa

plus grande largeur, une épine petite et forte. Bord occipital légèrement concave, presque droit.

A la face supérieure quelques poils, longs et minces et, près du bord occipital, une paire de soies plus longues. Sur la face inférieure, les poils forment deux séries longitudinales, irrégulières et submédianes, comme dans les espèces du genre *Boopia;* ils sont, cependant, plus petits que ceux existant d'ordinaire chez ces espèces. Soie oculaire grosse, raide, spiniforme.

Fig. 48 — *Paraboopia flava,* femelle.

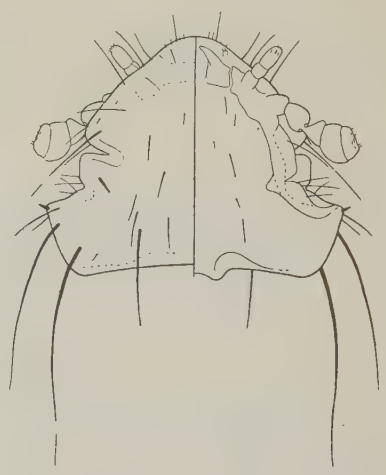


Fig. 49 — *Paraboopia flava,* tête.

Prothorax (fig. 50) court et large, scutiforme, avec saillie latérale anguleuse, ne portant sur les bords que des poils minces et souples, plus ou moins longs. Sur la face supérieure, une paire de petites épines aux extrémités de la bande transversale jaunâtre et une paire de soies, insérée plus en arrière. Metathorax dépourvu de piquants sur le bord postérieur.

Les pattes n'ont rien de particulier, si ce n'est de toutes petites saillies du tégument de la face interne du dernier segment tarsal, semblables à des poils ou a des piquants très délicats rangés en séries transversales et regulières.

Abdomen ovale, un peu plus moins large que long, aux bords crénelés et avec des taches jaunâtres sur les tergites et pleurites. Étant donnée la décoloration subie par nos spécimens, il semble que le nombre de plaques tergales soit plus élevé que celui que nous avons constaté. Sur les tergites et sternites, deux

Fig. 50 — *Paraboopia flava,* prothorax.

Fig. 51 — *Paraboopia flava,* extrémité postérieure de l'abdomen de la femelle.

Fig. 52 — *Paraboopia flava,* armature génitale du mâle.

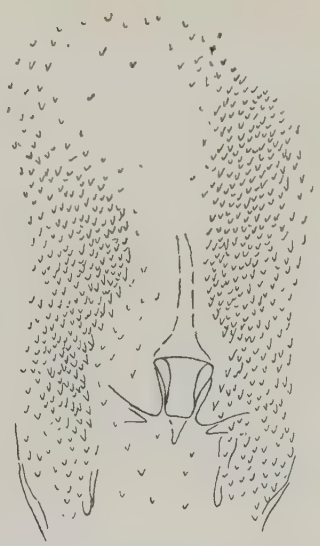


Fig. 53 — *Paraboopia flava,* vésicule pénième.

séries transversales de poils; la série antérieure composée de soies plus courtes. Sur les deux faces de l'abdomen, les soies se trouvent vers la région médiane, mais à la face supérieure il y a, en plus, deux rangées submarginales, une de chaque côté.

La région génitale (fig. 51) se rapproche beaucoup de celle des espèces du genre *Boopia*.

Mâle. Longueur: 1.26 mm.

A peu près semblable à la femelle, dont il ne se distingue que par la forme de l'extrémité postérieure de l'abdomen et par la présence d'une paire d'épines sur le bord inférieur des fémurs médians.

Armature génitale (fig. 52) sans rien de particulier dans sa forme générale. La vésicule pénième paraît manquer à côté du penis de pièces latérales chitinisées qui sont remplacées par des zones où les piquants, qui tapissent toute sa paroi, sont plus rapprochés (fig. 53).

Genre **Heterodoxus** Le Souëf & Bullen

1902 — *Heterodoxus,* Le Souëf & Bullen, Victorian Naturalist, vol. 18, pags. 159.
1908 — *Heterodoxus,* Kellogg, Genera Insectorum, fasc. 66, Mallophaga, pags. 75-76.
1912 — *Heterodoxus,* Paine, Entomological News, vol. 23, pags. 360-361.
1915 — *Heterodoxus,* Kellogg & Ferris, The Anoplura and Mallophaga of North American Mammals, pags. 66.
1916 — *Heterodoxus,* Harrison & Johnston, Parasitology, vol. 8, pags. 52.
1919 — *Macropophila,* Mjöberg, Entomologisk Tidskrift, vol. 40, pags. 95.
1929 — *Heterodoxus,* Ewing, Manual of External Parasites, pags. 102-103.

Diagnose: — Tête large, subtriangulaire, arrondie à l'extrémité antérieure et légèrement concave à l'occiput, où elle présente sa plus grande largeur. Bords latéraux divergents et droits, formant avec le bord antérieur un arc parabolique, appuyé aux extrémités du bord occipital. La tête a, donc, une forme générale tout à fait différente de celles du genre *Boopia*: privée des grandes échancrures latérales et possédant les sillons préoculaires très étroits, son contour devient fort régulier. A la face inférieure, deux appendices aigus, chitinisés, tournés en arrière et provenant de la cuticule tégumentaire épaissie, insérés près des palpes maxillaires. Tempes étroites, non saillantes.

Palpes maxillaires de 4 articles.

Deux forts piquants à la face supérieure du mesothorax, entourés d'une bande foncée.

Abdomen ovale allongée, avec de grandes plaques tergales et sternales, portant une série transversale de soies longues et fortes. Des poils plus petits existent parmi les grandes soies tergales et forment une série antérieure sur les sternites des segments typiques.

Trois paires de poils sensitifs sur les trois premiers anneaux de l'abdomen.

Six paires de stigmates, placés apparemment aux extrémités des plaques tergales de l'abdomen.

ESPECE TYPE: — *Heterodoxus longitarsus* (Piaget).

Genre **Paraheterodoxus** Harrison & Johnston

1916 — *Paraheterodoxus,* Harrison & Johnston, Parasitology, vol. 8, pags. 356-357.

DIAGNOSE: — Boopidae avec les caractères généraux du genre *Heterodoxus*, mais dépourvus à la face inférieure de la tête d'épines, formées par la cuticule tégumentaire épaissie, et portant des stigmates sur les pleurites abdominaux.

ESPECE TYPE: — *Paraheterodoxus insignis* Harrison & Johnston.

Ce genre, quoique très proche de *Heterodoxus,* est nettement caracterisé par la localisation des stigmates abdominaux. L'absence d'épines chitineuses à la face ventrale de la tête, ne nous paraît pas un accident anatomique de grande valeur, mais il présente l'avantage d'être un caractère facile à reconnaître, ce que simplifie le travail de determination. Cependant, il est necessaire d'attirer l'attention, comme nous avons fait dans la diagnose générique, sur la nature de ces formations et de ne pas les confondre avec des poils courts et forts, comme ceux de la région postérieure de la tête de *P. insignis*. D'après Harrison & Johnston, il y aurait « a pair of stout spines, not at the base of the palps, as in *Heterodoxus*, but posteriorly, on the gular margin », ce qui porte à croire que les piquants seraient semblables, la difference se trouvant seulement dans leurs position.

Paraheterodoxus insignis Harrison & Johnston

1916 — *Paraheterodoxus insignis,* Harrison & Johnston, Parasitology, vol. 8. pags. 357-359, figs. 13-14.

1916 — *Paraheterodoxus insignis,* Harrison, Parasitology, vol. 9, pags. 30.

1939 — *Paraheterodoxus insignis,* Thompson, Annals and Magazine of Natural History, Ser. 11, vol. 3, pags. 604.

HÔTE-TYPE: — *Aepyprymnus rufescens* Gray, de la Nouvelle-Galles du Sud.

SPECIMENS EXAMINES: —

1) Une femelle, recueillie sur *Aepyprymnus rufescens* du jardin zoologique de Sydney, Nouvelle Galles du Sud, par L. Harrison.

Cet exemplaire étiquetté comme type, appartient à la collection G. B. Thompson.

2) Une femelle, provenant du même hôte, sans aucune autre indication et appartenant aussi à la collection Thompson.

3) Deux femelles et un jeune trouvés sur *Wallabia bicolor*, de Gippsland, Victoria, par A. S. Le Souëf, en VI-1898. La détermination de ces exemplaires, en l'absence d'un mâle, ne peut être acceptée sans restrictions.

DESCRIPTION: — Femelle (fig. 54). Longueur: 2.84 mm.

Tête (fig. 55) deux fois aussi large que longue, parabolique, un peu déprimée vers les palpes, avec le bord antérieur convexe, les bords latéraux di-

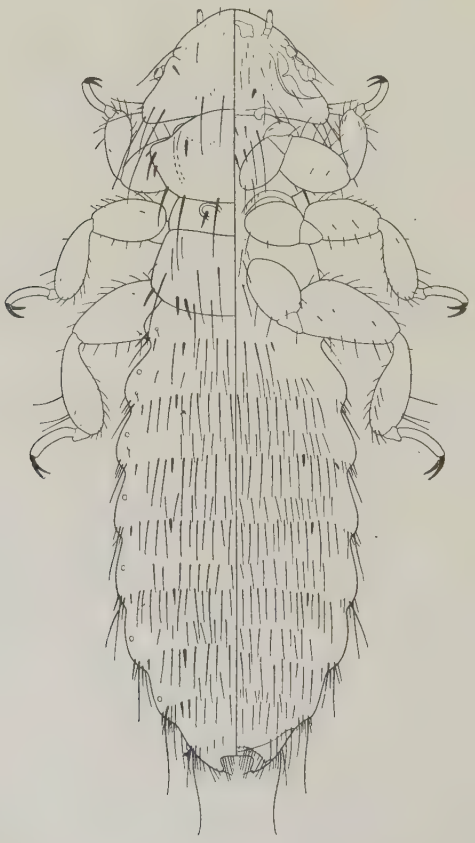


Fig. 54 — *Paraheterodoxus insignis*, femelle.

vergents et l'occipital à peu près droit; sur son contour, une fente étroite et profonde devant les yeux et une legère depression au niveau des soies oculaires.

A la face supérieure, les plus grandes soies presentent la disposition suivante: une sur les lobes préoculaires, deux aux angles temporaux et quatre près du bord occipital. Les tempes, la région occipitale et l'avant-tête, portent des poils plus courts.

Sur la face ventrale, les soies, dont la longueur augmente progressivement d'avant en arrière, forment deux groupes, disposés longitudinalement à côté de la ligne médiane avec une soie terminale particulièrement grande et forte. Trois ou quatre poils, aux bords inférieurs des sinus antennaux.

En plus des soies longues et souples, la tête porte encore des poils courts et forts, ressemblant à des piquants, sur les angles antérieurs des tempes et à sa face inférieure, près du bord occipital. Ces derniers sont de beaucoup les plus grands mais n'ont rien de commun avec les vraies épines chitineuses caractéristiques du genre *Heterodoxus*.

Soie oculaire petite, grosse et raide, spiniforme.

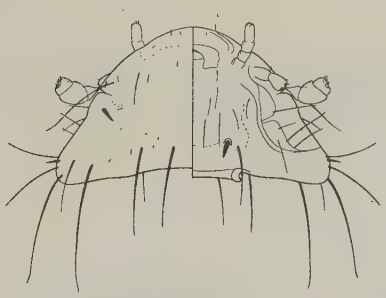


Fig. 55 — *Paraheterodoxus insignis*, tête.

Fig. 56 — *Paraheterodoxus insignis*, extrémité postérieure de l'abdomen de la femelle.

Palpes maxillaires longs et minces, débordant l'avant-tête. Antennes relativement petites.

Thorax deux fois plus long que la tête et presque aussi large que celle-ci.

Prothorax scutiforme, avec les extrémités latérales saillantes, anguleuses, portant trois paires d'épines. Sur ses bords, existent aussi trois paires de soies: celles qui sont en avant très fortes, les autres normales. A la face supérieure, une paire de piquants aux extrémités de la bande transversale jaunâtre, et à la face inférieure une plaque sternale, subtriangulaire portant des poils et des épines.

Mesothorax court, avec deux épines insérées sur des legères saillies des téguments de la face dorsale et trois autres sur les sclérites latéraux de la face ventrale.

Metathorax subrectangulaire, deux fois plus large que long, avec trois paires de forts piquants près du bord postérieur. A la face supérieure, quelques soies longues implantées, près des bords ou distribués à la surface du segment;

à la face inférieure, soies plus courtes, autour d'une plaque sternale peu colorée.

Les pattes, dont la forme n'a rien de particulier, sont progressivement plus longues d'avant en arrière. Les tibias de la première paire sont cependant plus forts que ceux des pattes médianes.

Abdomen étroit, à peu près deux fois plus long que large, aux bords crénelés garnis de soies raides. Tergites et sternites des segments typiques avec deux séries transversales de poils, l'antérieure formée de poils plus courts. Quelques épines parmi les soies de la série postérieure: quatre à la face supérieure et deux à la face inférieure. Celles-ci sont inserées régulièrement formant des rangées longitudinales sur les deux faces de l'abdomen: à la face tergale, deux submarginales et deux au milieu de l'espace compris entre la ligne médiane et les bords abdominaux; à la face ventrale les séries submarginales manquent et les deux autres se trouvent deux fois plus éloignées de la ligne mediane que des bords latéraux de l'abdomen.

Région génitale (fig. 56) avec des gonopodes petits, bordés de poils et placés en dessous des lobes terminaux de l'abdomen, dont l'extrémité porte une petite soie souple.

Mâle.

Nous n'avons pu examiner aucun exemplaire appartenant à ce sexe, mais d'après Harrison & Johnston le mâle ne se distingue de la femelle que par sa taille plus petite, par la forme de l'extrémité postérieure de l'abdomen et la présence d'une paire d'épines sur les bords inférieurs des fémurs medians.

Genre **Latumcephalum** Le Souëf

1902 — *Latumcephalum,* Le Souëf, Victorian Naturalist, vol. 19, n.º 3, pags. 51.
1908 — *Latumcephalum,* Kellogg, Genera Insectorum, fasc. 66, Mallophaga, pags. 76.
1916 — *Latumcephalum,* Harrison & Johnston, Parasitology, vol. 8, pags. 340.

Diagnose: — Tête très large, à peu près deux fois plus large que longue, et d'aspect caractéristique. Elle doit surtout cet aspect: à son avant-tête trilobée marquée de deux échancrures profondes formées par la réunion du bord antérieur avec les bords latéraux, au niveau des palpes; à ses tempes, dont les angles antérieurs sont considérablement plus éloignés de la ligne médiane que les postérieurs; et à la position de ces derniers par rapport au bord occipital. Bords latéraux avec deux sillons, un devant les yeux et un autre derrière ceux-ci. Tégument épaissi, formant plusieurs nodules saillants sur les deux faces de la tête. Tempes très larges, faisant saillie en dehors et en arrière.

Palpes maxillaires de deux articles.

Deux soies minces sur la face supérieure du mesothorax, entourées d'une bande circulaire foncée.

Abdomen long, légèrement coloré aux tergites et pleurites. Chaetotaxie semblable à celle des espèces du genre *Boopia.*

Pas de poils sensitifs sur les trois premiers anneaux de l'abdomen.

Six paires de stigmates sur les pleurites abdominaux.

ESPECE TYPE: — *Latumcephalum macropus* Le Souëf

Latumcephalum macropus Le Souëf

1902 — *Latumcephalum macropus,* Le Souëf, Victorian Naturalist, vol. 19, pags. 51, fig. 4.
1908 — *Latumcephalum macropus,* Kellogg, Genera Insectorum, fasc. 66, Mallophaga, pags. 76.
1916 — *Latumcephalum macropus,* Harrison & Johnston, Parasitology, vol. 8, pags. 340-343, figs. 2-3.
1916 — *Latumcephalum macropus,* Harrison, Parasitology, vol. 9, pags. 30.
1939 — *Latumcephalum macropus,* Thompson, Annals and Magazine of Natural History, ser. 11, vol. 3, pags. 605.

HÔTE-TYPE: — *Wallabia dorsalis* Gray (= *Macropus dorsalis*), du jardin zoologique de Melbourne.

SPECIMENS EXAMINES: —

1) Quatre préparations, avec trois femelles et un mâle, cotypes, appartenant à la collection G. B. Thompson.
2) Deux préparations de la même collection avec deux femelles recueillies sur *Wallabia bicolor*, de Victoria, par A. S. Le Souëf.

DESCRIPTION: — Femelle (fig. 57). Longueur: 1.27 mm.

Tête (fig. 58) large, arrondie en avant, limitée antérieurement par un petit bord convexe et presque droite à l'occiput. Les bords latéraux, d'abord courbes et divergents, deviennent ensuite, convergents à partir des angles temporaux antérieurs; entre ces angles temporaux antérieurs et les angles postérieurs des tempes, les bords convergent vers l'arrière; après ces derniers, la convergeance se fait vers l'avant-tête. Sur les côtés, un pli profond devant les yeux et derrière ceux-ci une petite encoche à peine visible. Entre ces deux accidents, le tégument de la tête est extrêmement mince et présente une surface chagrinée, rendant à cet endroit les bords latéraux finement dentelés. Tempes anguleuses, saillantes en dehors et en arrière.

Les plus grandes soies de la tête sont toutes périphériques et présentent les insertions suivantes: une sur chaque angle formé par les bords latéraux et les grands sillons marginaux; deux paires sur les tempes et une autre paire près du bord occipital. Les soies de longueur moyenne sont presque toutes réunies en deux groupes submédians sur les deux faces de la tête, ceux de la face ventrale formant une série longitudinale de chaque côté. Les plus petites se trouvent

surtout aux régions temporales. Il existe en plus, une petite épine sur les angles temporaux antérieurs.

Soie oculaire grosse, spiniforme, tournée en dedans, insérée sur un tubercule de tégument épaissi, à mi-distance de l'extrémité interne de la fente préoculaire et de l'angle temporal postérieur.

Fig. 57 — *Latumcephalum macropus*, femelle.

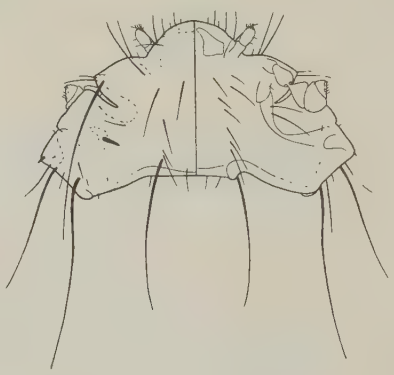


Fig. 58 — *Latumcephalum macropus*, tête.

Thorax long et étroit, avec les trois segments nettement délimités. Prothorax transversalement allongé, aux extrémités latérales fortement anguleuses. Métathorax à peu près aussi long et aussi large que le prothorax, mais bien plus long que le mésothorax, ce dernier étant reduit à une bande comprimée entre les deux autres segments thoraciques. Sur les deux faces du thorax, ainsi que sur ses bords, des soies souples plus au moins longues, mais pas de piquants, même sur les tubercules chitineux de la face tergale du mésothorax.

Les pattes ont l'aspect général commun à tous les mallophages des marsupiaux australiens. Les derniers segments des tarses sont cependant beaucoup plus courts.

Abdomen long et étroit, aux bords crénelés portant de longues soies. Les spécimens examinés, montés depuis longtemps, avaient une légère coloration jaunâtre sur les tergites et pleurites, mais nous craignons qu'ils n'aient subi une décoloration. Cette couleur serait donc plus forte. Tergites et sternites des anneaux typiques avec deux séries transversales de soies; l'antérieure formé de soies plus petites et moins nombreuses. A la face supérieure de l'abdomen, la plupart des soies sont reunies en un groupe allongé dans la région médiane. Entre celles-ci et les grandes soies marginales, existe une série longitudinale formée par une soie longue et deux poils courts sur chaque tergite. Ces séries manquent à la face ventrale.

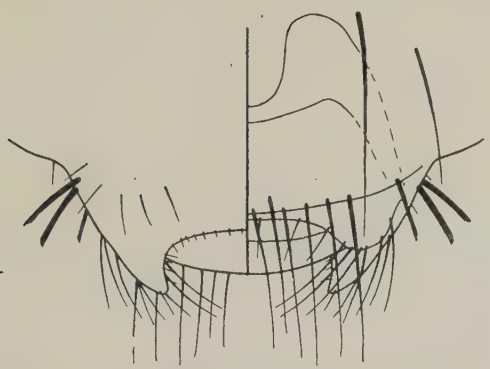


Fig. 59 — *Latumcephalum macropus,* extrémité postérieure de l'abdomen de la femelle.

Fig. 60 — *Latumcephalum macropus,* armature génitale du male.

Région génitale (fig. 59) avec deux petits gonopodes, bordés de poils, placés en dessous des appendices postérieurs de l'abdomen, dont les extrémités portent une soie flexible.

Mâle. Longueurs: 1.27 mm.

A peu près semblable à la femelle, mais avec une épine sur les bords inférieurs des fémurs médians.

L'armure génitale (fig. 60) a une structure générale identique à toutes celles de la famille des *Boopidae.* Il nous a été impossible d'étudier les formations chitineuses de la vésicule pénième entièrement dechirée dans l'unique exemplaire que nous avons pû nous procurer.

Latumcephalum lesouëfi Harrison & Johnston

1916 — *Latumcephalum lesouëfi,* Harrison & Johnston, Parasitology, vol. 8, pags. 343-344, figs. 2-3.

1916 — *Latumcephalum lesouëfi,* Harrison, Parasitology, vol. 9, pags. 30.

1939 — *Latumcephalum lesouëfi,* Thompson, Annals and Magazine of Natural History, Ser. 11, vol. 3, pags. 605.

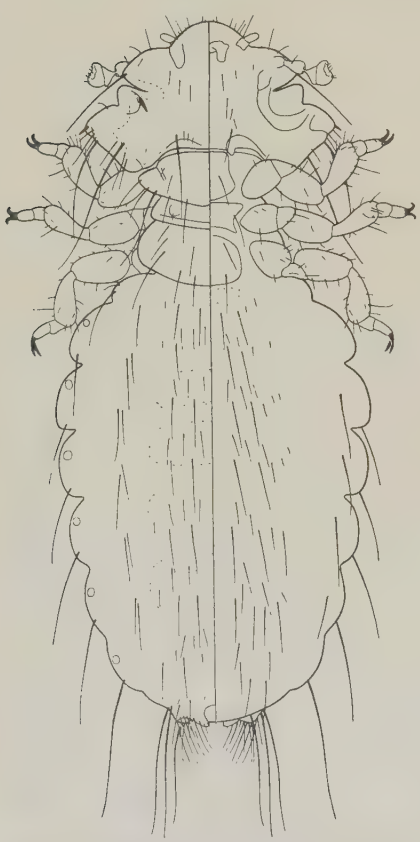


Fig 61 — *Latumcephalum lesouëfi,* femelle.

Fig. 62 — *Latumcephalum lesouëfi,* tête.

Fig. 63 — *Latumcephalum lesouëfi,* extrémité postérieure de l'abdomen de la femelle.

Hôte-type: — *Wallabia bicolor* Desmarest (= *Macropus ualabatus*), de Victoria.

Specimens examines: —

1) Tous les spécimens-type: un mâle et deux jeunes, appartenant à la collection G. B. Thompson.

2) Une femelle, provenant du même hôte et de la même localité, appartenant aussi à la collection Thompson.

3) Un grand nombre d'individus des deux sexes et des jeunes collectionés par A. E. Hamerton, le 15-V-1929, sur un exemplaire de *Wallabia bicolor*, originaire de la Nouvelle-Galles du Sud et en captivité au jardin zoologique de Londres. Tout ce matériel, partie monté, partie conservé en alcool, appartient au Musée Britannique.

DESCRIPTION: — Femelle (fig. 61). Longueur: 1.30 mm. Mâle. Longueur: 1.27 mm.

Cette espèce se rapproche beaucoup de *L. macropus*, mais elle s'en distingue par des caractères faciles à apprécier.

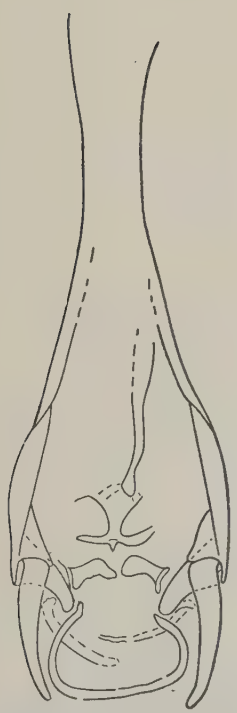


Fig. 64 — *Latumcephalum lesouëfi*, armature génitale du mâle.

Fig. 65 — *Latumcephalum lesouëfi*, patte médiane du mâle.

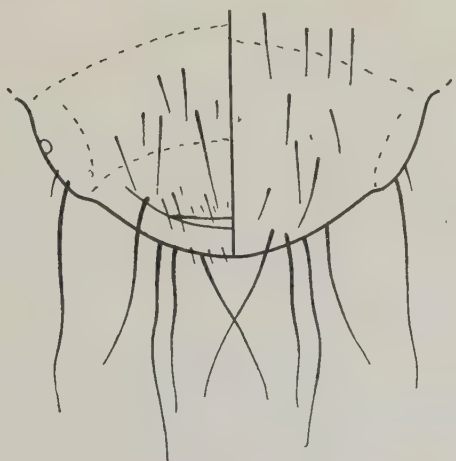


Fig. 66 — *Latumcephalum lesouëfi*, extrémité de l'abdomen du mâle.

La tête (fig. 62) a une forme nettement différente, avec les tempes plus saillantes en arrière et des grands angles rentrants sur les bords latéraux, derrière les yeux. Le tégument des bords de ces échancrures n'a rien de particulier: son épaisseur ainsi que sa surface sont normales, sans anincissement et sans rugosités.

La soie oculaire, spiniforme, se trouve tout près du bord de la grande fente marginale et non à mi-distance de celle-ci et de l'angle temporal postérieur.

Thorax plus court et plus large; abdomen plus grand (fig. 61).

La région génitale de la femelle (fig. 63) et l'appareil copulateur du mâle (fig. 64) ne presentent aucune différence sensible.

Le mâle possède le même caractère sexuel secondaire que celui de *L. macropus:* une épine sur les bords inférieurs des fémurs médians (fig. 65) et, comme chez cette espèce, l'extrémité postérieure de l'abdomen est nécessairement modifiée (fig. 66).

TABLE DES ESPECES D'APRES LEURS HOTES[1]

Antechinus flavipes Waterhouse

Phacogalia brevispinosus

Dasyurus quoll Zimmermann

Boopia uncinata

Dasyurinus geoffroyi Gould

Boopia uncinata

Vombatus ursinus Shaw

Boopia tarsata

Vombatus hirsutus Perry

Boopia tarsata

Perameles nasuta Geoffroy

Boopia phanerocerata

Lasiorhinus latifrons Owen

Boopia dubia

Aepyprymnus rufescens Gray

Boopia bettongia

Paraheterodoxus insignis

Dendrolagus lumholtzi Collett

Dendrolagia pygidialis

Wallabia bicolor Desmarest

Boopia spinosa
Boopia nota-fusca
Boopia tarsata
Paraheterodoxus insignis
Latumcephalum lesouëfi
Latumcephalum macropus

Wallabia dorsalis Gray

Boopia minuta
Latumcephalum macropus

Osphranter robustus Gould

Boopia nota-fusca
Paraboopia flava

Megaleia rufa Desmarest

Boopia grandis

Macropus major Shaw

Boopia mjöbergi
Boopia grandis
? Boopia nota-fusca

---

[1] La plupart des spécimens enrigistrés dans ce travail a été recueillie sur des animaux de ménagerie. exposés á des contaminations. Dans ces conditions il est très difficile d'établir avec certitude leurs parasites habituels, ce qui aurait d'ailleurs le plus grand interêt. Pour cette raison, chaque fois qu'un hôte présente plusieurs mallophages d'un même genre, nous signalons d'abord celui que nous parait lui être particulier.

Ensaio monográfico da familia Cyathodiniidae *

pelos

Drs. A. Marques da Cunha e Gilberto de Freitas

(Com 8 estampas)

Indice

Pags.

I) Introdução 458
II) Material e métodos de pesquisa 459
III) Ocurrencia e distribuição 461
IV) Morfologia geral 462
V) Biologia geral 466

a) Funções de nutrição 466
b) Funções de movimento 467
c) Funções de reprodução e ciclo evolutivo 468
d) Enquistamento 477

VI) Sistematica 478

Genero *Cyathodinium* Cunha, 1914 479
Caractéres gerais e diagnose 479

a) *Cyathodinium conicum* Cunha, 1914 480
b) *C. scotti* n. sp. 481
c) *C. pentagonum* n. sp. 481
d) *C. chagasi* Cunha e Freitas, 1935 482
e) *C. breve* n. sp. 483

Genero *Cyathodinioides* Cunha e Freitas, 1936 483
Caractéres gerais e diagnose 483

a) *Cyathodinoides piriforme* (Cunha, 1914) 483
b) *C. vesiculosus* (Cunha, 1914) 484
c) *C. intermedius* n. sp. 484
d) *C. parvus* n. sp. 485

VII) Parasitas dos *Cyathodiniidae* 485
VIII) Discussão 486
IX) Resumo e conclusões (Summary and conclusions) 491
X) Bibliografia 493

* Recebido para publicação a 14 de Março de 1940 e dado á publicidade em Setembro de 1940.

I) INTRODUÇÃO

Em 1914 um de nós (Cunha) descreveu um novo genero de ciliado habitante do céco do roedor *Cavia aperea* Erxl., que denominou *Cyathodinium*. Este genero, inicialmente composto de tres especies (*C. conicum, C. vesiculosum* e *C. piriformis*), não permitia, por seus caracteres, a inclusão em qualquer uma das familias conhecidas, tendo sido então fundada, para os ciliados em questão, a familia *Cyathodiniidae*, Cunha, 1914, colocada entre os *Holotricha*.

Pouco tempo depois, Hasselmann (1926) descreveu a variedade *furcatum* de *Cyathodinium conicum*, baseado na existencia de exemplares deste protozoario com a extremidade posterior bi ou trifurcada.

A primeira verificação da existencia deste genero fóra da America do Sul foi devida a Fantham (1925), que notificou a presença de *Cyathodinium conicum* na cobaia da Africa do Sul.

Contudo, nenhum dos trabalhos publicados até aquela época dava conta de qualquer uma das caracteristicas que os ciatodiniideos apresentam na sua morfologia e evolução, caracteristicas essas que lhes emprestam intensa originalidade morfologica e evolucional. O primeiro fato que chamou a atenção para os ciatoniideos, foi relatado por Cunha e Muniz (1930), quando, num trabalho em que foi descrito o método de divisão de *Cyathodinium conicum*, patenteou-se a posição excepcional destes protozoarios entre os ciliados, por apresentarem um plano de divisão longitudinal. Além desta caracteristica morfologica evidenciada pelos AA. acima citados, outras foram descobertas por Lucas (1932, *a*, *b*), que, em dois trabalhos, estudou detidamente a morfologia e ciclo evolutivo de *Cyathodinioides piriformis* encontrado no céco de cobaias da America do Norte. No primeiro destes trabalhos, Lucas estuda a morfologia do ciliado, admitindo a existencia de um dimorfismo (formas A e B) assim como a ocorrencia de organelas especiais de sustentação, que denominou endosprits. No segundo trabalho, consagrado á biologia, são descritos os processos de multiplicação, que se efetuam por divisão binaria longitudinal, precedida de perda da ciliatura; duas novas ciliaturas se formam então em vacuolas no interior do plasma. Tais processos eram até então absolutamente desconhecidos entre os ciliados. Neste mesmo trabalho, foi descrito um processo de reorganisação do componente cinetico não acompanhado de multiplicação do protozoario, consistente na perda da ciliatura, e formação, por mecanismo analogo áquele que ocorre durante a divisão, de uma nova ciliatura no interior do plasma. Ao lado dos processos de reorganisação cinetica, outros da mesma natureza ocorreriam na esfera do aparelho nuclear, que seriam

motivo de um novo trabalho, e que, ao que sabemos, ainda não foi publicado.

Infelizmente, porém, ao lado das observações tão interessantes que acabamos de assinalar, confundiu o A., como uma especie unica, ou melhor, como dois estadios evolutivos de uma mesma especie, duas entidades especificas perfeitamente distintas, pertencentes mesmo a duas familias diferentes. Assim descreveu como forma *B* de *Cyathodinioides piriformis*, o ciliado *Enterophrya piriformis*, Hass., anteriormente descrita por Hasselmann como uma especie autonoma e pertencente á familia *Enterophryidae*, Hass., 1918. Resulta de tal confusão, que todas as formas de evolução descritas e representadas nos trabalhos de Lucas, referem-se á *Enterophrya piriformis* e não á *Cyathodinioides piriformis*, como julga o A. E' certo, como se verá adiante, que os estudos que aqui relataremos, provam que estas duas familias possuem afinidades morfologicas e evolucionais bastante conspicuas. Por outro lado, a impossibilidade que Lucas experimentou em caracterisar o micronucleo em certos estadios em que o protozoario se enche de cromidios provenientes da degeneração macronucleiforme dos restos de divisões do micronucleo, acrescida ainda da analogia evocada por este A. entre a formação da ciliatura em *C. piriformis* e a dos flagelos em *Lophomonas* (flagelado hipermastigoto), deixou uma certa duvida sobre a verdadeira posição filogenetica dos ciatodiniideos. Assim Mesnil (1932), referindo-se aos trabalhos de Cunha e Muniz e de Lucas, põe em duvida que estes protozoarios sejam ciliados. Na realidade, os ciatodiniideos formam um grupo assáz aberrante, é verdade, mas de ciliados perfeitamente caracteristicos. Assim sendo, todas as pretensas analogias com flagelados são absolutamente irreais.

Tendo a nossa atenção voltada para esses organismos pelas pesquisas de um de nós com Muniz e pelas observações de Lucas, iniciamos um estudo do grupo, cujos primeiros resultados já foram parcialmente expostos em duas notas (Cunha e Freitas, 1936, 1936*a*), e, presentemente, apresentamos mais detalhadamente os fatos adquiridos em relação á morfologia, ciclo evolutivo, sistematica e filogenia do grupo.

II) MATERIAL E MÉTODOS DE PESQUISA

O material utilisado nas nossas pesquisas foi colhido principalmente no céco de *Cavia aperea*, Erxl, onde ciatodiniideos e enterofriideos são encontrados em grande abundancia, qualitativa e quantitativamente. As porções inferiores do grosso intestino tambem foram examinadas para pesquisa de cistos, em menor escala porém.

Os exames *in vivo* foram praticados diluindo-se o conteúdo intestinal numa gota de solução de cloreto de sodio a 9‰, e examinando-se logo em seguida. Nestas condições os cialodiniideos e enterofriideos mostram grande labilidade, pois não sobrevivem mais que uma hora. Passados os primeiros minutos de observação, iniciam-se os processos degenerativos, tomando tanto o plasma como o nucleo, o aspéto que apresentam após fixação. Apesar de não permitir longas observações, o exame *in vivo* prestou inestimaveis serviços, sobretudo na comprovação de estruturas observadas nos preparados fixados e corados, como por exemplo das zonas ciliares internas. Assim, o estudo *in vivo* permitiu constatar a absoluta identidade de estrutura entre as zonas ciliares internas estudadas nestas condições e em material fixado e corado por diferentes métodos, assim como a imobilidade dos cilios enquanto permanecem no interior do corpo do protozoario.

Distenções em laminula fixadas a humido foram empregadas na execução de todos os métodos.

Para o estudo da morfologia geral, estruturas nucleares em repouso e em evolução, cilios e zonas ciliares internas, os melhores resultados foram obtidos com um método de coloração pela hemateina ferrea proposto por um de nós (Freitas, 1937), após fixação pelo picroformol de Bouin. A diferenciação foi efetuada por uma solução saturada de acido picrico no alcool a 95%, diluida em igual volume de alcool com a mesma concentração. O pH da solução corante variou de 7,4 a 7,6.

Além deste, os seguintes métodos foram ensaiados:

Sublimado-alcool de Schaudinn mais acido acetico (5%) — Hematoxilina ferrea de Heidenhein.

Sublimado-alcool de Schaudinn mais acido acetico (5%) — Azul de Metil-eosina de Mann-Dobell.

Sublimado-alcool de Schaudinn mais acido acetico (5%) — Mallory (para tecido conjuntivo).

Sublimado-alcool de Schaudinn (sem acido acetico) — Reação de Feulgen.

Sublimado-alcool de Schaudinn (sem acido acetico) — Magenta-picro-indigocarmin.

Picroformol de Bouin — Hematoxilina ferrea de Heidenhein.

Zenker-Helly — Mann-Dobell.

Von Rath — Hematoxilina ferrea de Heidenhein.

Da Fano — Chatton-Lwoff.

Em relação ao método de Heidenhein, o maximo de resultados na demonstração das zonas ciliares internas e endosprits, é passivel de ser obtido somente em córtes, mesmo após o emprego do fixador de Von Rath preconisado por Lucas. Aliás, as variações observadas no emprego de um mesmo método em distenções e em cortes já foram notadas por numerosos autores, entre os quais Cleveland (1934) que no seu grande trabalho sobre os flagelados simbioticos de *Cryptocercus punctulatus* relata observações interessantes, relativas ao determinismo da coloração do centriolo de *Barbulanympha*, flagelado hipermastigoto simbiotico deste blatídeo primitivo.

O método de impregnação argentica de Chatton e Lwoff (1935) deu muito bons resultados na demonstração da infraciliatura, sendo impossivel qualquer informação sobre a sua atividade em relação ás zonas ciliares internas, por não termos encontrado nenhuma forma em reorganisação ou divisão no material preparado por este método.

O método de Borrel foi aplicado com o intuito de estabelecer uma possivel diversidade de comportamento nas reações cromaticas entre estruturas em forma de barra presentes no macronucleo dos ciatodiniideos e os granulos de cromatina (v. Calkins, 1930).

De grande valor no estudo da evolução do componente cromatico foi a reação de Feulgen, executada em distenções fixadas a humido pelo sublimado-alcool de Schaudinn. Os preparados permaneceram tres minutos e meio na hidrólise e uma hora no reativo sulfo-fucsinico. Tivemos aqui a ocasião de observar o fato de que, afóra os granulos de cromatina e os cromidios libertados durante os processos de degeneração macronucleiforme dos restos das divisões sexuais do micronucleo, tambem os detritos de celulose presentes no conteúdo cecal dão positiva a reação de Feulgen. Tal fato já foi verificado em preparados de natureza diversa como o conteúdo intestinal dos termitas (Kidder, 1929) é perfeitamente explicavel, dada a presença de substancias com função aldeído, resultantes da hidrólise da celulose.

III) OCURRENCIA E DISTRIBUIÇÃO

Até a presente data, os membros da familia *Cyathodiniidae*, bem como os da familia *Enterophryidae*, são conhecidos apenas como habitantes do grosso intestino de roedores herbivoros. Entre estes portadores destes ciliados, aquele que certamente apresenta maiores infecções é a *Cavia aperea*, Erxl, cujo nome vulgar é *preá*. No céco das preás capturadas nos capinzais visinhos ao Instituto, são encontradas, salvo raras excepções, uma ou varias especies de ciatodiniideos e enterofriideos, associados mais

frequentemente a *Entodinium caviae*, porém comumente a *Cunhaia curvata* e *Balantidium mamilatum*, entre os ciliados. Em relação aos flagelados que mais frequentemente se acham associados aos ciliados em questão, figuram varias especies do genero *Chilomitus* que, com exceção da especie *caviae* creada por Fonseca, ainda não foram descritas, e que constituem um genero extremamente interessante, graças á sua morfologia aberrante, muito sumariamente estudado. *Selenomonas palpitans* é tambem frequentemente encontrado. Preás provenientes de Villa Nova, localidade distante aproximadamente 100 quilometros da Capital, não demonstraram diversidade de fauna.

Dos ciatodiniideos, as especies mais frequentes são *Cyathodiniodes piriforme* e *Cyathodinium conicum*.

Na cobaia encontra-se com escassa frequencia *Cyathodinioides piriformis*, sendo que nenhum outro ciliado do grupo foi até agora encontrado neste roedor, aqui no Rio de Janeiro.

Afóra as observações de ciatodiniideos nos roedores brasileiros, somente duas referencias são encontradas na literatura; a primeira, de Fantham (loc. cit.), que acusou a existencia de *Cyathodinium conicum* em cobaias na Africa do Sul, e a de Lucas (loc. cit.), que realisou os estudos acima referidos em cobaias provenientes de dois pontos dos Estados Unidos da America do Norte (Pensilvania e Saint Louis). Do mesmo modo, os unicos protozoarios que mostram uma indubitavel afinidade com os ciatodiniideos — os enterofriideos — apresentam uma distribuição muito limitada, pois afóra os hospedeiros citados para os ciatodiniideos, somente se conhece como portador de enterofriideos, *Hydrocherus capybara*, Erxl (capivara), que hospeda *Enterophrya piriformis* e *elongata* ou especies muito proximas.

E' certo que, com Penido, um de nós (Cunha e Penido, 1927) encontrou um protozoario apresentando afinidades morfologicas com os enterofriideos, num peixe do rio Paraguay e que denominaram *Rhynchodinium paradoxum*. Este protozoario, naquella época considerado de posição sistematica indecisa, tem sido referido como tal em livros de Protozoologia. Somente estudos posteriores elucidarão as questões relativas a este organismo. No fim do trabalho voltaremos á questão dos protozoarios relacionados com os ciatodiniideos.

IV) MORFOLOGIA GERAL

Forma do corpo — Pode-se distinguir nos *Cyathodiniidae*, em relação á forma do corpo, dois tipos morfologicos, que correspondem aliás aos dois generos que compõem a familia. O primeiro tipo, correspon-

dendo ao genero *Cyathodinium*, apresenta forma conica com a base voltada para diante e terminando posteriormente em ponta mais ou menos arredondada e por veses bi ou trifurcada (*Cyathodinium conicum* var. *furcatum*). O segundo tipo que corresponde ao genero *Cyathodinioides*, apresenta contorno piriforme ou oval, é fortemente achatado no sentido lateral, terminando posteriormente em pequeno prolongamento rombo, dirigido obliquamente para o lado dorsal.

Em ambas as fórmas, observa-se na parte anterior e ventral, uma escavação de forma e dimensões variaveis, de acordo com o tipo morfologico. Assim, no genero *Cyathodinium* tal escavação é pouco profunda e a sua abertura lateral se prolonga somente num percurso correspondente a 1/3 a 1/5 do comprimento do corpo. No genero *Cyathodinioides*, ao contrario, essa escavação é muito mais desenvolvida, ocupando por veses a maior parte do corpo e estendendo-se a cerca de 2/3 ou mais do seu comprimento total. A esta escavação demos o nome de pseudoperistoma, denominação que será justificada no decorrer do trabalho.

A membrana do ciliado de estrutura semelhante á dos demais é delgada e de espessura uniforme.

Abaixo da membrana existe uma camada de ectoplasma igualmente delgada e que tambem em nada se afasta da organisação geralmente observavel nos demais ciliados.

O endoplasma dos ciatodiniideos apresenta nos preparados corados aspéto granular. Com grande aumento pode-se observar a presença de vacuolos muito pequenos, entre os quais ficam colocados os granulos. Um fato de grande importancia que o exame do endoplasma fornece é a ausencia absoluta de vacuolos com inclusões alimentares.

Os ciatodiniideos apresentam nitida duplicidade nuclear, sendo até mesmo material propicio para demonstração desta condição, pois, em estado de repouso o micronucleo é facilmente observavel, já pelas suas dimensões, já por sua colocação em relação ao macronucleo.

O macronucleo é geralmente redondo, por veses alongado (*Cyathodinium vesiculosus* e *C. intermedius*). E' constituido geralmente de granulos relativamente volumosos em comparação com os do macronucleo de outros ciliados, regulares, dispostos uniformemente e de modo compacto. Essa estrutura é a que se observa nos preparados bastante diferenciados, pois quando a diferenciação após as colorações pela hemateina ferrea não é suficientemente prolongada, o macronucleo apresenta o aspéto de uma esfera intensamente corada, onde mal se percebe a existencia de granulos, mesmo quando as outras estruturas já se acham suficientemente diferenciadas. Muitas veses, correspondendo a certos estadios de evolução, os granulos do macronucleo perdem a uniformi-

dade, apresentando-se alguns mais volumosos e chegando a exibir o aspéto de blocos de forma irregular.

Tambem algumas veses o macronucleo apresenta forma alongada, mesmo em especies em que é normalmente esferico. Em tais casos, observa-se quasi sempre a presença no nucleo de uma formação especial cuja descrição daremos a seguir. Esta formação apresenta aspétos variaveis, sendo que na maior parte das veses é constituida por um bastonete que atravessa o nucleo diametralmente, terminando por uma ponta em bisel (figs. 4 e 6). Esta pode ser mais ou menos pronunciada, sendo que excepcionalmente as pontas são vistas arredondadas (fig. 5). Por veses toda esta formação é contida no interior do nucleo, outras, porém, faz saliencia nas duas extremidades. Pode-se observar tambem uma forma acicular para a estrutura em descrição, se bem que não tão frequentemente. Em regra não se encontra mais que uma unica estrutura em cada nucleo; casos ha, porém, que varias formações são observaveis em um unico nucleo, assumindo nestas circunstancias a forma acicular. Outras veses, é possivel observar a existencia de um espaço claro que percorre o bastonete de uma extremidade a outra, dando o aspéto de uma clivagem (fig. 5). E' contudo impossivel afirmar si esta figura está ligada á formação das aciculas multiplas assinaladas. Nos nucleos portadores de tais formações, a cromatina é como que recalcada para a periferia, deixando entre si e a barra central um espaço claro. O aspéto descrito corresponde ao que se observa nos preparados corados pela hemateina ferrea, para a qual esta formação manifesta uma afinidade variavel, pois ora se cora tão intensamente quanto a cromatina, ora sensivelmente menos que ela. Por veses se observa, em lugar da barra cromofila, um espaço em claro como se representasse a sua imagem negativa. Pelo que observamos, não se pode estabelecer qualquer relação entre esta estrutura e estadios de evolução nuclear. Do mesmo modo as reações cromaticas e mesmo o comportamento não autorisam o estabelecimento de qualquer afinidade com o *Kernspalt* dos ciliados *Hypotrichida*. Assim parece mais certo interpretar a estrutura em questão, como de natureza cristaloide, como frequentemente ocorre nas células vegetais.

O micronucleo apresenta particularidades morfologicas bem interessantes. Em primeiro lugar, é bastante volumoso em relação ás dimensões do macronucleo. Em segundo logar, a sua posição em relação a esta organela, foge daquilo que se observa frequentemente nos outros ciliados, pois muitas veses ele fica colocado afastado do micronucleo e, embora por veses situado nas proximidades, nunca chega a ficar justaposto a este e muito menos numa depressão, como frequentemente ocorre

em outros ciliados. Convém acentuar que estas observações se referem a individuos neutros, não apresentando consequentemente nenhum sinal de evolução. Quanto á estrutura, o micronucleo é redondo, fortemente cromofilo e envolvido de um halo claro bem nitido.

A ciliatura é limitada á parte anterior do protozoario e é constituida de cilios finos, uniformes, dispostos em linhas transversais, colocadas ora perpendicularmente ao eixo longitudinal do corpo (*Cyathodinium*), ou obliquamente a este (*Cyathodinioides*). O numero de linhas ciliares é variavel segundo a especie e constante para cada uma delas, embora a sua contagem seja muito dificultada pelas linhas de cilio que se encontram no calice do pseudoperistoma. As linhas de cilios que ocupam a parte posterior da região ciliada dão uma volta completa na superficie externa do ciliado. Estas linhas são sempre em pequeno numero e muitas veses se reduzem a uma ou duas linhas somente. As demais, encontrando em seu percurso a abertura lateral do pseudoperistoma, aí penetram percorrendo a sua superficie interna para sair do lado oposto e continuar seu percurso até dar uma volta completa na superficie interna do protozoario.

Os cilios se inserem em corpusculos basais nitidos, dispostos abaixo da membrana do ciliado.

No genero *Cyathodinium* observa-se na cavidade do pseudoperistoma uma saliencia de forma conica de cujo ápice parte uma estrutura tendo o aspéto de tubo ôco que se afila progressivamente, terminando encurvada, mais ou menos na metade anterior do corpo (figs. 1 e 2). Na sua extremidade anterior, exatamente no ápice da saliencia conica acima referida, observa-se um granulo cromofilo. Essa organela tubular, por veses aparentemente unica, se subdivide durante o seu trajeto em duas ou tres outras, sendo sempre uma mais espessa que as demais. A interpretação a ser dada á estrutura em questão será posteriormente discutida. Contudo desde já propomos a designação de *cyathostylo*[1] que tem vantagem de não presupor qualquer interpretação sobre a sua natureza e função. No bordo posterior da cavidade do pseudoperistoma e proximo á sua base, encontra-se uma estrutura cromofila que frequentemente assume a forma semi-lunar (fig. 1).

No genero *Cyathodinioides* não são encontradas as organelas acima descritas, mas em compensação outras foram descritas por Scott-Lucas que lhes denominou *endosprits* (fig. 3). Essa denominação tem o inconveniente de representar um hibridismo etimologico, razão pela qual propomos substituil-o pela de *chilostilo*[2]. Tais organelas, que se assentam no

1 *Κύαος* = calice; *στύλος* = estilete.
2 *Χείλος* = labio; *στύλος* = estilete.

labio esquerdo do pseudoperistoma, têm a forma de bastonetes que se afilam gradualmente á medida que se aprofundam no corpo, terminando em ponta afilada. Embora muito mais curtos, os quilostilos têm igualmente uma estrutura tubular, e, vistos no sentido do comprimento, aparecem sob a forma de aneis. Os quilostilos ficam colocados no interior do plasma, com a extremidade mais espessa voltada para a luz da cavidade do pseudoperistoma, fazendo saliencia na membrana do corpo. Nesta porção dos quilostilos, toma nascença em um granulo basal aí colocado, um cilio semelhante aos demais. A distribuição destas organelas é variavel segundo as especies. Assim, numas especies, agrupam-se em fileiras unicas, enquanto que em outras reunem-se de maneira compacta, formando um campo triangular cuja base se volta para trás (*Cyathodinioides vesiculosus* e *C. intermedius*). Nestes ciliados, além dos quilostilos grupados outros se acham disseminados desordenadamente por toda a superficie interna do labio esquerdo.

Lucas atribue aos quilostilos o papel de orgãos de sustentação, e essa é tambem, a nosso ver, a função destas organelas.

Voltando ao genero *Cyathodinium*, queremos assinalar que os ciatostilos podem ser interpretados tambem como tendo uma função de sustentação semelhante á dos quilostilos do genero *Cyathodinioides*. A posição dos ciatostilos difere, porém, profundamente da dos chilostilos, e este fato nos leva a cogitar de uma outra interpretação talvez mais provavel, que é a de considerar esta organela como um provavel « reliquat » de um faringe obliterado.

V) BIOLOGIA GERAL

a) FUNÇÕES DE NUTRIÇÃO

Já na observação da morfologia dos ciatodiniideos, chamamos a atenção para o fato de nunca se encontrarem no endoplasma inclusões ou vacuolos alimentares. Esta observação de « per si » já levava a crer que a nutrição dos protozoarios ora em estudo se fizesse por osmose, apesar da vasta cavidade existente na extremidade anterior, cuja semelhança com um peristoma tipico é tão grande, que foi considerada como tal pelos primeiros observadores destes protozoarios (Cunha, loc. cit., Lucas, loc. cit.).

Para esclarecer as contradições existentes entre os dados fornecidos pelas observações morfologicas acima expostas, procuramos estudar detalhadamente a questão da nutrição desses protozoarios. Para este fim, utilisamos, de um lado, a observação cuidadosa do ciliado *in vivo*, por outro, praticamos experiencias de ingestão de particulas figuradas. As

observações *in vivo*, praticadas segundo a tecnica já descrita, nunca permitiram verificar a ingestão de quaisquer particulas presentes no meio. E' certo que muitas veses se observa a entrada na cavidade do pseudoperistoma de organismos varios tais como bacterias, *Selenomonas* e outros microorganismos existentes no céco. Sempre porém tais organismos, depois de aí permanecerem tempos variaveis, são expulsos pela fenda lateral do pseudoperistoma, acarretados pela mesma corrente que lhes deu entrada. Particulas de carmim adicionadas ao liquido de suspensão do material deu identicos resultados nestas observações. Contudo, as conclusões originadas destas verificações eram, embora valiosas, passiveis de objeções de ordem tecnica, por não se encontrarem os ciliados no seu meio natural, onde as suas funções se realisam normalmente.

Este fato nos levou a instituir experiencias nas quais tal objeção ficasse eliminada. Para isto, faziamos os animais em experiencia ingerirem uma suspensão de carmim ou tinta da China, sacrificando-os 2 a tres horas depois, para observação dos ciliados do céco. Os resultados destas experiencias foram absolutamente concordantes com os das anteriores, pois enquanto que outros ciliados habtiantes do céco, tais como *Entodinium mamilatum*, *Cunhaia curvata* e *Balantidium caviae* se mostravam repletos de granulos corados no seu endoplasma, as diversas especies de ciatodiniideos mostraram-se inteiramente livres de particulas de tinta da China ou de carmim. Como se pode verificar, nestas experiencias os ciliados estiveram em contato com as particulas durante longo tempo e em seu meio natural, de sorte que a restrição que se poderia formular para as primeiras experiencias não tem absolutamente razão de ser aqui. Aliás é necessario não omitir que as observações morfologicas cuidadosas nunca revelaram a presença de qualquer estrutura que pudesse ser interpretada como um verdadeiro citostoma.

b) FUNÇÕES DE MOVIMENTO

As verificações relativas ao movimento dos ciatodiniideos foram igualmente feitas em material do céco diluido em solução fisiologica a 9%, colocado entre lamina e laminula e observado imediatamente após. Nestas condições, eles apresentam logo á primeira vista, movimentos relativamente lentos, contrastando com a rapidez com que sè deslocam outros ciliados existentes no mesmo material, tais como *Entodinium mamilatum*, *Cunhaia curvata* e outros.

O deslocamento dos ciatodiniideos se faz sempre acompanhado de rotação do corpo. Além disto se observa que quando estes protozoarios não se deslocam no campo do microscopio, o movimento dos cilios dão origem a uma corrente que, penetrando pela parte anterior da fenda do

pseudoperistoma e chegando ao fundo desta cavidade, muda de direção, saindo pela parte lateral da mesma fenda.

c) FUNÇÕES DE REPRODUÇÃO E CICLO EVOLUTIVO

No estudo do ciclo evolutivo dos ciliados da familia *Cyathodiniidae*, devemos considerar, em primeiro logar, os fenomenos que se passam no interior do tubo digestivo do hospedeiro, e em seguida aquelas que asseguram a transmissão do parasita de um hospedeiro a outro.

No primeiro caso, teremos a considerar de um lado o processo de multiplicação que se faz por divisão binaria e de outro os fenomenos de reorganisação que, ao contrario do que ocorre na maioria dos ciliados, se processa sem a interferencia do ato de conjugação. Sobre as formas que garantem a transmissão destes ciliados, observações feitas nas porções inferiores do grosso intestino demonstraram serem cisticas estas formas.

Divisão:

O processo de divisão apresenta particularidades que já foram parcialmente expostas em trabalhos anteriores, e que separa este grupo dos demais ciliados. Em primeiro logar, o plano de divisão, transverso nos demais ciliados, é aqui ou perfeitamente longitudinal (*Cyathodinium*) ou ligeiramente obliquo (*Cyathodinioides*). Outro ponto de divergencia é constituido pelo desaparecimento total da ciliatura e formação, por ocasião de cada divisão, de duas novas ciliaturas que têm origem em vacuolos no interior do plasma. Em seus traços fundamentais, o processo de divisão é identico para todos os ciatodiniideos. Contudo, como veremos no decorrer do trabalho, além da diferença verificada em relação ao plano de divisão, apresentam detalhes outros, variaveis com a especie. O estadio mais precoce de divisão foi observado em *Cyathodinium chagasi* (fig. 7). Neste estadio, a forma geral do corpo, bem como a ciliatura e o pseudo-peristoma não apresentam qualquer modificação na sua morfologia, bem como o macronucleo que mostra a sua estrutura normal. O micronucleo já se apresenta em mitose, exibindo uma figura de metafase. O eixo da mitose coincide com o eixo longitudinal do protozoario, fato comprovado por observações em outras especies. Os caracteres desta mitose nada apresentam que a diferencie das mitoses somaticas do micronucleo dos demais ciliados. O que se encontra porém de mais caracteristico nesta forma de divisão, é a presença de duas zonas ciliares internas rudimentares, colocadas na parte média do corpo simetricamente em relação ao eixo longitudinal do corpo do ciliado. Neste estadio, as

zonas ciliares são formadas por vacuolos relativamente pequenos, de seção triangular e situados perto da zona mediana do corpo. A partir desta fase, sofre o protozoario importantes modificações na sua morfologia, modificações essas consequentes da evaginação do pseudo-peristoma e de um notavel alargamento da região mediana do corpo. Disto resulta que o protozoario que em repouso se apresenta alongado, passa a exibir uma forma romboidal. O desaparecimento do pseudo-peristoma é acompanhado da perda dos cilios, que deixam a principio na membrana do ciliado ligeiras depressões marcando as linhas em que eles se inseriam (fig. 8).

O macronucleo mostra nessa primeira fase a estrutura de repouso que só se modifica posteriormente.

A deformação do corpo do ciliado que acabamos de descrever a proposito de *C. chagasi*, não é observada em todas as especies da familia; ao contrario falta na maioria delas. Assim no *C. chagasi* e *C. breve* é a evaginação do pseudoperistoma a principal causa da deformação, acrescida ainda da ampliação do diametro transverso apenas na zona mediana do corpo. Nas demais especies, o desaparecimento do pseudo-peristoma não se faz por evaginação e sim por um processo de obliteração que nunca é completo, pois deixa sempre na extremidade anterior ligeira depressão, como reliquat da cavidade do pseudo-peristoma. Além disto, o alargamento do corpo não se faz tão precocemente, e quando se dá em fase já mais avançada do processo de divisão, opera-se de modo uniforme em quasi toda a extensão do corpo do protozoario.

Acompanhando as alterações acima descritas, prosegue a divisão do micronucleo pelo alongamento do fuso e migração da cromatina para os pólos. A evolução da mitose é acompanhada da rotação do eixo do fuso, que, de longitudinal, torna-se transversal (*Cyathodinium*(fig. 8) ou obliquo (*Cyathodinioides*).

As ciliaturas em vias de formação no interior do plasma apresentam-se aumentadas de volume, ocupando posição simetrica em relação ao eixo do corpo, um pouco adiante da zona de maior largura (fig. 9). Esta posição foi observada em *C. chagasi*, que é uma especie que sofre grandes alterações morfologicas durante a divisão. Nas demais especies deste genero, que não apresentam as profundas alterações morfologicas, as zonas ciliares, embora simetricas em relação ao eixo longitudinal do corpo, têm posição muito anterior (fig. 10). Já no genero *Cyathodinioides*, a posição das zonas ciliares é diferente, pois embora simetricas, não o são em relação ao eixo longitudinal do corpo, porém a uma linha obliqua que sempre é perpendicular ao eixo de divisão do micronucleo. Desta forma as duas ciliaturas se acham situadas, uma na parte antero-dorsal e outra na postero-ventral do corpo (figs. 12 e 13).

Numa fase posterior, sem que o ciliado sofra qualquer modificação na sua forma, completa-se a divisão do micronucleo, deixando os micronucleos-filhos a principio um longo filamento entre si. Na mesma fase as ciliaturas apresentam um desenvolvimento integral, apresentando-se sob a forma de duas grandes vesiculas de secção triangular, mostrando nitidamente ao longo de suas paredes, as fileiras de granulos basais, donde partem cilios perfeitamente desenvolvidos, imoveis porém, quando examinados *in vivo* (figs. 9 e 46).

Só então se inicia a divisão do macronucleo que se faz por processo amitotico.

As fases finais da divisão do corpo não foram observadas em todos os seus detalhes na totalidade das especies. Em algumas, *C. conicum* por exemplo, este fato foi satisfatoriamente observado. Em primeiro logar as ciliaturas se abrem para o exterior, sofrendo uma evaginação parcial, da qual resulta que uma parte vae recobrir a superficie externa do corpo, enquanto que a porção não evaginada constituirá a cavidade do pseudo-peristoma. Aparece então em cada extremidade do corpo do ciliado já então mutio alargado, duas chanfraduras que, progredindo no sentido longitudinal, vão separando os dois ciliados-filhos, os quais, até que a divisão seja completa com o encontro das chanfraduras na zona mediana do corpo, permanecem ligados por um istmo protoplasmatico nesta região (fig. 11). No *C. chagasi*, porém, a unica forma final de divisão observada mostra que esta se passa de maneira diferente. A divisão do plasma se inicia pela parte anterior e os ciliados-filhos conservam-se reunidos pela parte posterior, sofrendo cada um deles um movimento de rotação em sentido contrario u mdo outro (fig. 47).

No genero *Cyathodinioides* não foi possivel observar detalhadamente a divisão do corpo; contudo, algumas formas finais observadas tanto em *Cyathodinioides piriforme* como em *C. parvus* (fig. 14), mostra os ciliados-filhos ainda reunidos pela parte dorsal, o que demonstra que neste genero a divisão se processa de maneira semelhante á do genero *Cyathodinium*, isto é, em sentido longitudinal, embora o plano de divisão apresente certa obliquidade.

Antes de terminar a descrição do processo de divisão dos *Cyathodiniidae*, não queremos omitir as observações referentes ao comportamento, durante a divisão, de certas organelas como os ciatostilos do genero *Cyathodinium* e os quilostilos dos *Cyathodinioides*. Quer uma quer outra destas organelas desaparece nas primeiras fases do processo, coincidindo o seu desaparecimento com o dos cilios, bem como com as alterações do pseudo-peristoma. Mais tarde, estas organelas são neoformadas com as ciliaturas, como demonstra a fig. 9. Os ciatostilos se for-

mam na extremidade posterior da zona ciliar interna, onde aparecem sob a fórma de curtos bastonetes afilados numa extremidade e apresentando na outra, exatamente naquela pela qual se implanta na zona ciliar, um granulo cromofilo. Na mesma ocasião observa-se o aparecimento da placa cromofila semilunar encontrada no fundo do pseudo-peristoma.

Os chilostilos do genero *Cyathodinioides* demonstrando igualmente sua natureza cinetica, tambem desaparecem durante a divisão, e, embora não tivessemos observado em detalhe sua neoformação, tudo leva a crer que esta se faça de maneira semelhante á observada durante os processos de reorganisação, conforme descreveremos posteriormente.

E' importante salientar certos pontos exaustivamente verificados em virtude de sua importancia, como se verificará no Capitulo de « Discussão ». Assim, como demonstram as figuras 12 e 52, os *Cyathodinioides* não sofrem perturbações morfologicas, guardando ao contrario a forma tipica do genero em todos os estadios do seu ciclo evolutivo, salvo evidentemente quando em processo de franca cisão do corpo. Outro ponto importante refere-se ao comportamento da cavidade do pseudo-peristoma que, embora em grande parte obliterada, não desaparece de todo, conservando-se sempre bem visivel e representada por uma depressão na zona correspondente á sua abertura.

Reorganisação:

O primeiro fato a assinalar no estudo dos fenomenos de reorganisação, é que os individuos em que eles se processam, não diferem dos demais, nem pelas dimensões, nem pela morfologia, a não ser, bem entendido, pelas particularidades que caracterisam as diversas fases do fenomeno. Deste modo, não é possivel estabelecer aqui, pela fórma e dimensões, uma distinção entre individuos neutros e individuos em reorganisação, tal como acontece na endomixia de *Balantidium simile* (Cunha e Muniz, 1930), onde as diferenças de dimensões tornam muito facil tal distinção.

No processo de reorganisação podemos distinguir duas fases; a primeira representada pela reorganisação do aparelho nuclear e a segunda que consiste na perda dos cilios e formação de nova ciliatura que se efetua como no processo de divisão, no interior do plasma do ciliado.

A reorganisação nuclear, que precede sempre á formação de nova ciliatura, embora identica no fundo, apresenta aspétos diferentes conforme se trata do genero *Cyathodinium* ou do genero *Cyathodinioides*. Esse fato nos obrigou, para maior clareza, a descrever separadamente esse processo em cada um dos generos que constituem a familia. Já a reorganisação

ciliar se faz nos dois generos por processo semelhante, permitindo desse modo uma descrição conjunta.

Reorganisação nuclear no genero « Cyathodinium » :

Mesmo dentro deste genero, o processo de reorganisação apresenta variações especificas, bastante superficiais contudo, para impedir uma descrição conjunta. Contudo certas especies, que já no processo de divisão apresentaram como vimos um comportamento peculiar, aqui tambem se afastam das demais. Tais diferenças referem-se sobretudo ás modificações na forma do corpo, bem como á maneira pela qual se comporta o pseudo-peristoma durante os fenomenos que descreveremos:

Os fenomenos de reorganisação se iniciam pela divisão do micronucleo. Antes da divisão, esta organela se mostra aumentada de volume, e a cromatina que normalmente se dispõe de modo compacto, passa a se apresentar frequentemente sob a fórma de granulos perfeitamente individualisaveis. A divisão do micronucleo se faz por mitose, que, embora não se afastando do esquema observado nesses ciliados, apresentam maiores dimensões que aquela que se verifica durante a divisão destes protozoarios. Contudo, enquanto que as mitoses somaticas variam pouco na sua posição, pois não se afastam da parte mediana do corpo, as que ocorrem nos fenomenos de reorganisação se realisam nos mais variados pontos do corpo. Assim a mitose que forneceu a figura 16, por exemplo, estava situada na extremidade anterior do protozoario, ao lado da fenda lateral do pseudo-peristoma. Queremos chamar a atenção para alguns detalhes estruturais observados nestas mitoses. Assim observamos sempre a presença de dois centriolos muito pequenos porém nitidos, ligados por fina centrodesmose. Muitas veses os centriolos ficam justapostos á membrana nuclear (fig. 17), o que poderia levantar suspeita sobre a exatidão de sua posição em relação a ela, isto é, se na realidade os centriolos dos ciliados em estudo são intra- ou extranucleares. Estadios intermediarios que tivemos ocasião de observar, como o da figura 16, onde os centriolos ainda se mostram afastados da membrana do nucleo, permitem a verificação inconteste de que estas entidades cineticas se acham no interior do nucleo.

Os cromosomas são pequenos e numerosos, o que impossibilita a sua contagem, e geralmente apresentam forma granular (fig. 16). Em metafase contudo apresentam formas de bastonetes (fig. 15), formas estas naturalmente ligadas á divisão desses cromosomas.

Desta primeira mitose do micronucleo se originam dois micronucleos-filhos (fig. 18), que entram em divisão, da qual resultam 4 micronucleos (fig. 19).

Os caracteres das segundas mitoses em nada diferem dos da primeira.

Na fig. 19 os produtos da segunda divisão do micronucleo se apresentam muito pouco cromofilos, o que se explica de um lado pela diferenciação avançada do preparado que fornece o exemplar desenhado, e de outro pela disposição pouco compacta da cromatina, o que acarreta tambem o aumento de volume observado, fato facilmente explicavel por se acharem esses elementos ainda incompletamente reorganisados.

Destes 4 produtos da divisão do micronucleo, um deles sofre nova mitose, enquanto que os tres restantes entram em degeneração (figs. 20 e 21). Esta regressão se dá por uma progressiva condensação da cromatina, de modo que, no inicio da degeneração, ostentam o aspéto de um micronucleo de menores dimensões, e terminam reduzidos a um granulo extremamente cromofilo. A degeneração dos restos da divisão do micronucleo é lenta; ela persiste nos estadios subsequentes da evolução, prolongando-se até fases muito avançadas do fenomeno.

Já no estadio que acabamos de descrever, caracterisado como vimos pela divisão de um dos produtos de divisão do micronucleo e pela presença da placenta, começam a ser observaveis as primeiras alterações do macronucleo. Tais alterações que assumem desde inicio um carater nitidamente degenerativo, consiste na transformação dos granulos de cromatina, que, primitivamente de forma e arranjo regulares, passam a assumir o aspéto de blocos de forma e dimensões irregulares, dispostos arbitrariamente.

Como já descrevemos mais acima, enquanto que tres dos produtos de divisão do micronucleo degeneram, um quarto sofre nova mitose, da qual resultam dois nucleos que terão destinos diferentes. Assim um deles, justamente aquele que se destina a constituir novo micronucleo, evolue neste sentido, guardando sempre uma morfologia analoga á desta organela em estado de repouso, embora apresente a principio dimensões maiores e cromatina mais dispersa (fig. 22). O outro, destinado a constituir o novo macronucleo, sofre uma evolução que apresenta ligeiras variações especificas. No *C. chagasi* por exemplo ha um aumento relativamente rapido de volume, de maneira que a cromatina se apresenta a principio sob a forma de granulos dispersos. Uma tal organisação dá a este macronucleo em formação (placenta) o aspéto de uma vesicula pouco cromofila finamente granular (fig. 22). Em outras especies, tais como o *C. conicum*, o crescimento é mais lento, e, em compensação, a cromatina se

mostra mais condensada, tomando a placenta desde logo um aspéto semelhante a um macronucleo tipico, de menores dimensões, contudo.

Durante a formação da placenta, o macronucleo continua a sua degeneração que se faz por picnose. Os blocos de cromatina condensam-se em uma massa unica que diminue progressivamente de volume, á medida que se tornam cada vês mais cromofilos. Nos ultimos estadios, reduzido a uma massa de dimensões exiguas e tomando intensamente os corantes nucleares, dá-se a fragmentação do macronucleo em poucos blocos que cedo desaparecem.

Reorganisação nuclear do genero « Cyathodinioides » :

No genero *Cyathodinioides*, embora os aspétos se mostrem diversos dos observados no genero *Cyathodinium*, os fenomenos de reorganisação se efetuam por meio de um mecanismo identico. Como no genero *Cyathodinium*, a organisação aqui se passa em individuos que em nada diferem dos neutros. Igualmente ha de inicio uma divisão do micronucleo da qual resultam dois outros que, sofrendo nova divisão, vão formar quatro elementos, dos quais tres degeneram, sofrendo o quarto elemento nova mitose da qual se formará, ainda como no genero *Cyathodinium*, o novo aparelho nuclear do ciliado.

E' justamente na forma pela qual se realisa a degeneração dos tres restos das divisões micronucleares, que se manifestam as diferenças de comportamento do genero *Cyathodinioides*, diferenças essas que dão lugar a aspétos tão diversos e originais. Assim estes nucleos, longe de se condensarem diminuindo de volume, aumentam rapidamente, apresentando dimensões quasi identicas ás do macronucleo (fig. 25). Tal aumento se realisa porém com uma velocidade variavel para cada um dos restos, resultando daí apresentarem estes dimensões diferentes.

Assim, um aspéto muito frequentemente observado, é justamente aquele representado nas figuras 25 e 51, onde vemos dois nucleos maiores que são respectivamente o macronucleo e um dos restos mais desenvolvido, e dois menores que são os restos menos desenvolvidos. Atingidas certas dimensões, a cromatina dos nucleos em degeneração se dispõe em granulos irregulares, a principio condensados, e apresentando em seguida uma progressiva rarefação. Coincidindo com a diminuição do numero de granulos nesses restos, observa-se o aparecimento no plasma de granulações cromofilas (fig. 24), que, em preparados corados pelo método de Feulgen, mostram-se constituidas de cromatina.

A degeneração do macronucleo, que se inicia neste estadio, se efetua por um mecanismo analogo ao que vem de ser descrito, o que contribue

para dificultar a interpretação das figuras nesta fase, onde o protozoario apresenta quatro nucleos de forma bizarra simulando macronucleos em degeneração e o plasma repleto de granulações cromofilas (fig. 26). A presença de tais granulos de dimensões variadas, dificulta ou impossibilita mesmo o reconhecimento do micronucleo, que contudo pode ser identificado na grande maioria das veses pela regularidade da forma, maiores dimensões e presença de um nitido halo claro que o circunda. O processo degenerativo continua até reduzir os restos das divisões do micronucleo a vesiculas quasi vasias no interior das quais só se observam alguns granulos ou bastonetes aciculares.

A degeneração do macronucleo se processa lentamente, de modo que esta organela persiste já em fases nas quais os restos das divisões do micronucleo se acham inteiramente reduzidos a granulos cromofilos. Assim, o desaparecimento completo do macronucleo só se verifica em fases muito avançadas do processo de reorganisação.

Este modo particular de degeneração dos restos provenientes das divisões do micronucleo, já foi descoberto por Ivanic (1928) na endomixia das formas enquistadas de *Chilodon uncinatus,* sendo por ele denominada de *degeneração macronucleiforme* (*macronucleusartige*), embora dela difira na fase final da degeneração, pois aqui não ha expulsão do nucleo mas sim a sua resolução integral em granulos cromaticos que se disseminam pelo plasma do ciliado, concomitantemente com os fenomenos que acabamos de descrever.

Convém salientar que tambem aqui nos *Cyathodinioides* o processo degenerativo corre com uma velocidade variavel para cada nucleo, disto resultando formas em que, ao lado de nucleos já completamente desintegrados, outros ainda persistem, dando logar a formas com numero variavel de nucleos. Na figura 27, ao lado de um resto que juntamente com o macronucleo apresenta uma estrutura caracteristica, apesar de apresentarem indicios de desagregação, ha outros dois restos onde os processos degenerativos se apresentam avançados, que já se acham reduzidos a simples grumos cromofilos de forma irregular.

Como dissemos acima, o unico elemento que não degenera entre os quatro resultantes das divisões micronucleares, sofre nova mitose, dando logar a dois nucleos-filhos (fig. 26), um dos quais formará o micronucleo e o outro o macronucleo do novo aparelho nuclear do ciliado. A formação da placenta a partir deste ultimo, pode-se dar contudo antes do desaparecimento dos restos, de modo que formas existem, em que se observam cinco nucleos em vez de quatro. Na figura 28 observa-se este fato; aqui contudo os restos apresentam um contorno piriforme que constitue aliás exceção e que pode ser explicado admitindo a hipótese de que a dege-

neração se tenha iniciado antes da reconstituição do nucleo após a divisão. Tal fato, que nos ciatodiniideos seria uma exceção, é a regra na degeneração do macronucleo, durante a endomixis de *Balantidium simile* (Cunha e Muniz, 1930).

Reorganisação ciliar:

Coincidindo com os ultimos estadios da reorganisação nuclear acima descritos, se inicia a reorganisação do aparelho ciliar. Aqui não foi possivel observar estadios tão precoces como durante a divisão. Este fato constitue uma das razões pelas quais não nos foi possivel precisar a fase do processo de evolução nuclear na qual se instalam os de reorganisação ciliar. Aliás, os fatos observados nos indicam claramente que não ha um sincronismo perfeito entre os dois fenomenos, pois ao lado de formas em reorganisação ciliar que apresentavam um aparelho nuclear perfeitamente constituido, indicio de reorganisação já terminada, outras ha, nas quais as zonas ciliares aparecem em individuos que ainda deixam ver ao lado de uma placenta em evolução, um macronucleo em degeneração incipiente (fig. 32).

No genero *Cyathodinioides* um exemplar foi mesmo observado em que, ao lado da zona ciliar interna já desenvolvida, se observava ainda os restos da divisão do micronucleo em via de degeneração macronucleiforme.

Durante o processo de reorganisação ciliar, os ciliados sofrem a perda dos cilios e apresentam modificações de forma semelhantes ás observadas durante a divisão. Assim *Cyathodinium chagasi*, especie em que melhor se poude observar o fenomeno de reorganisação tanto nuclear como ciliar, sofre evaginação do pseudo-peristoma que desaparece totalmente e alargamento da parte mediana do corpo tomando o mesmo aspéto romboidal já observado durante a divisão (fig. 30). Uma deformação semelhante foi tambem assinalada no *Cyathodinium breve* (figs. 31 e 34). Já as demais especies do genero *Cyathodinium* conservam a forma do corpo, apresentando-se apenas um pouco alargadas, sendo que o pseudo-peristoma, embora diminuido, não desaparece totalmente, ficando sempre representado por pequena escavação. No genero *Cyathodinioides*, a forma do corpo tambem não sofre alteração e o pseudo-peristoma, embora reduzido de profundidade, conserva-se sempre perfeitamente visivel durante todo o processo (figs. 33 e 52). A ciliatura interna, depois de completamente desenvolvida, abre-se para o exterior, exatamente ao nivel do antigo pseudo-peristoma e sofre evaginação parcial, adquirindo deste modo a forma tipica do genero. Na estampa fig. 34 representamos um exem-

plar em que já se realisou a abertura da zona ciliar interna, mas não se iniciou ainda o processo de evaginação, conservando-se assim a ciliatura limitada ao interior do pseudo-peristoma.

Antes de terminar o estudo do fenomeno de reorganisação na familia *Cyathodinidae* queremos assinalar um fato interessante que constitue uma peculiaridade dessa familia. Ao contrario do que ocorre na conjugação de outros ciliados e na endomixia do *Balantidium simile*, não existem aqui formas anomalas ou pelo menos elas são tão raras que não nos foi dado observal-as com segurança.

d) ENQUISTAMENTO

No estudo dos *Cyathodinioides* dedicamos especial atenção á procura de formas quisticas que assegurassem a transmissão desses ciliados de um hospedeiro a outro. Para esse fim, fizemos mesmo, muitas veses preparados do conteúdo de porções diversas do grosso intestino. No decurso dessas pesquisas formas quisticas foram observadas, embora se mostrassem relativamente raras. Foi principalmente no *C. chagasi* que as formas quisticas foram mais bem estudadas, podendo-se mesmo nessa especie acompanhar o processo de enquistamento. Mais raramente foram encontradas formas de quistos pertencentes certamente a outras especies sem que se pudesse entretanto identificar a especie a que pertenciam. Os quistos dos *Cyathodinium* apresentam forma oval e são cercados de uma membrana bem diferenciada que muitas veses se destaca em alguns pontos da massa plasmica interior. Esta apresenta macronucleo e micronucleo cuja estrutura não difere dos das formas vegetativas. Observa-se ainda no interior dos quistos a presença de uma ciliatura interna semelhante á que se encontra nas formas em via de reorganisação ciliar. A presença dessa ciliatura interna sugere, em relação á sua origem duas hipóteses. A primeira, aquela que se é levado a admitir em primeiro logar por analogia, é que essa ciliatura se origina de um processo de reorganisação por endomixia que se processasse no interior do quisto; a outra, á primeira vista menos provavel, é que ela provenha da ciliatura da forma vegetativa por um processo de invaginação. A presença de formas como as representadas na fig. 54 em que se observa a ciliatura em via de invaginação, indicam claramente que é essa ultima realmente a origem da ciliatura observada no interior do quisto. No *C. chagasi* foi possivel ainda o estudo das formas que precedem o fenomeno de enquistamento. Nos preparados em que formas quisticas eram encontradas com frequencia ao lado de formas vegetativas, encontramos tambem formas semelhantes a essas morfologicamente porém mais curtas, em que a re-

lação comprimento-largura era de 1,6 a 1,7 quando normalmente elas oscilam entre 2,3 a 2,9. Apresentam ainda essas formas a extremidade posterior arredondada e as linhas de cilios mais proximas umas das outras. Em alguns desses individuos podia-se observar mesmo nitidamente o espessamento da membrana do ciliado em via de transformação na membrana quistica (fig. 53). A essas formas daremos a designação de formas prequisticas.

Nas formas quisticas que tivemos ocasião de observar, nunca verificamos qualquer indicio de evolução no interior dos quistos, embora não se possa excluir a possibilidade de sua existencia ulterior.

VI) SISTEMATICA

A familia *Cyathodiniidae* creada por um de nós (Cunha) em 1913, para um grupo de ciliados de ordem *Holotricha*, constitue, de acordo com os resultados expostos sobre sua morfologia e biologia, um grupo natural, bem definido, que se afasta por caracteres nitidos dos demais ciliados conhecidos até então. E' certo que possue estreitas afinidades com a familia *Enterophryidae* como teremos ocasião de relatar. Esta familia, porém, de acordo com o que dela se conhece até então, goza da mesma posição de isolamento taxonomico, de modo que, longe de constituir um um ponto de contato entre os *Cyathodinidae* e os demais *Holotricha*, sugere antes a ideia de virem a constituir as duas familias um grupo taxonomico superior.

De acordo com os conhecimentos atuais a familia *Cyathodinidae* pode ser assim definida:

Diagnose — « Ciliados *Holotricha*, *Astomata*, com duplicidade nuclear nitida, apresentando uma escavação mais ou menos profunda situada na face anterior e lateral. Ciliatura uniforme, constituida de linhas transversais ou obliquas, que ocupam o interior dessa escavação e a parte externa situada ao mesmo nivel. Multiplicação por divisão longitudinal ou obliqua com perda dos cilios e formação endogena de duas novas ciliaturas. Reorganisação por endomixia seguida da perda dos cilios e formação endogena de uma nova ciliatura. Transmissão por meio de quistos. »

Tambem dos estudos efetuados decorre naturalmente, conforme já assinalamos em trabalho anterior, a sub-divisão da familia em dois grupos, nitidamente separados por caracteres morfologicos e biologicos, constituindo os dois generos *Cyathodinium* e *Cyathodinioides*.

Antes de passarmos ás diagnoses dos dois generos bem como ás

descrições das especies que as constituem, queremos assinalar as diferenças marcantes existentes entre elles.

Assim, a forma do corpo é no genero *Cyathodinium* geralmente conica, enquanto que no genero *Cyathodinioides* é mais ou menos ovalar. No primeiro a cavidade do pseudo-peristoma é pouco profundo e se estende lateralmente no maximo até 1/3 do comprimento do corpo, sendo destituido de organelas especiais de sustentação (quilostilos); já no segundo, a cavidade do pseudo-peristoma é muito mais desenvolvida, estendendo-se lateralmente muitas vêses até 2/3 ou mais do comprimento do corpo, sendo além disso dotado de organelas de sustentação (*quilostilos*).

Em compensação possue o genero *Cyathodinium* organelas tais como a placa cromofila semi-lunar e os *ciatostilos* que não encontram similar no genero *Cyathodinioides*.

No genero *Cyathodinium*, as linhas de cilios ocupam posição nitidamente transversal, isto é, correm perpendicularmente do eixo do corpo, enquanto que no genero *Cyathodinioides*, elas são obliquas em relação a esse eixo.

No primeiro desses generos, a divisão é longitudinal, isto é, o plano de clivagem coincide com o eixo do corpo e as duas ciliaturas neoformadas ocupam posições simetricas em relação ao mesmo eixo; já no segundo, a divisão é obliqua e as duas novas ciliaturas não ocupam posições simetricas em relação ao eixo do corpo, sendo uma antero-dorsal e outra postero-ventral. Tambem no processo de reorganisação se diferenciam os dois generos, embora seja em ambos fundamentalmente identico. Assim, no genero *Cyathodinium* a degeneração do macronucleo bem como dos restos de divisão do micronucleo se faz por picnose ao passo que no genero *Cyathodinioides*, o macronucleo desaparece por um processo de desagregação em granulos e os restos de divisão do micronucleo, após crescimento que lhes confere aspéto semelhante ao macronucleo, têm o mesmo destino deste (degeneração macronucleiforme).

Genero **Cyathodinium**, Cunha 1914

Diagnose — « Corpo de fórma conica, cavidade do pseudo-peristoma pouco profunda, prolongando-se na face ventral até o maximo de 1/3 do comprimento do corpo e desprovido de organelas de sustentação especiais (quilostilos). Presença no fundo dessa cavidade de placa semilunar e de ciatostilos. Divisão longitudinal. Durante o processo de reorgani-

sação a degeneração do macronucleo se faz por picnose. Especie tipo *Cyathodinium conicum*, Cunha 1913.

Já vimos como esse genero difere nitidamente do genero *Cyathodinioides*. Queremos agora assinalar que, embora se enquadrando na diagnose precedente, as diversas especies que constituem esse genero, apresentam diferenças na maneira de se comportarem durante os processos de divisão e reorganisação. Assim, no *Cyathodinium conicum*, bem como em outras especies, no decurso desses fenomenos, o pseudo-peristoma sofre um processo de obliteração que nunca é total, deixando sempre no logar deste uma pequena escavação. Desse modo, não se observa nessas especies a profunda alteração de forma que se dá em outros. Já no *Cyathodinium chagasi* e *C. breve*, o pseudo-peristoma sofre um processo de evaginação que faz com que ele desapareça completamente, modificando profundamente a forma do corpo que toma então um perfil romboidal. Além disso, a cisão do plasma no *Cyathodinium conicum* e especies afins tem inicio nos dois extremos e progride pouco a pouco, deixando os ciliados-filhos ligados pela parte média do corpo ocupando posições paralelas um ao outro até completa separação. Já no *Cyathodium chagasi* (no *Cyathodium breve* não foram observadas formas finais de divisão), o inicio da cisão do plasma se faz pela extremidade anterior, deixando os dois ciliados-filhos ligados pela parte posterior, sofrendo estes um movimento de rotação em sentidos opostos, vindo a ocupar, no termino do fenomeno, uma linha perpendicular ao eixo do individuo que lhe deu origem.

Julgamos que essas diferenças não são de molde a constituirem um genero diverso, mas propomos incluir as duas especies a que nos referimos e que divergem das demais nos detalhes assinalados, em um subgenero á parte, que denominaremos *Paracyathodinium*.

Cyathodinium (Cyathodinium) conicum Cunha, 1914

(Figs. 36 e 37)

Corpo de fórma conica com base voltada para diante, apresentando a extremidade posterior, dois aspétos diferentes. Assim, em alguns individuos ela se apresenta em ponta ligeiramente arredondada, enquanto que em outros, justamente os que se encontram com maior frequencia, a extremidade posterior apresenta dois ou tres prolongamentos largos e curtos, ligeiramente divergentes e com as extremidades arredondadas. Este segundo aspéto constitue a fórma *furcatum* de Hasselmann.

Tambem o pseudo-peristoma deixa ver dois aspétos diferentes, havendo porém entre eles todos os intermediarios, o que exclue a hipótese da existencia de fórmas distintas, tratando-se apenas de estadios de maior ou menor distensão do pseudo-peristoma. Quando este apresenta abertura maxima, o ci-

liado se alarga na extremidade anterior, a sua cavidade é ampla e seu prolongamento na face ventral estende-se de 1/4 a 1/3 do comprimento do corpo, apresentando um dos bordos mais ou menos perpendicular ao eixo maior do ciliado, e outro obliquo, de modo que, a abertura lateral, mais larga anteriormente, estreita-se gradualmente para trás. Em outros individuos, a cavidade do pseudo-cristoma é muito menor devido á aproximação dos dois labios, e, assim sendo, o corpo do ciliado em vez de se alargar, se estreita na extremidade anterior, ficando a abertura lateral reduzida nos casos extremos a uma simples fenda.

As linhas de cilios são em numero aproximado de 10, sendo extremamente dificil a sua contagem exata, devido á deficiencia de percepção das linhas que se encontram na extremidade anterior, pois aí se assentam diretamente na borda do pseudo-peristoma.

O macronucleo é redondo, e o micronucleo, como nas demais especies do genero, é volumoso e afastado do macronucleo.

O vacuolo contratil, unico, fica situado por trás do macronucleo.

Dimensões médias: comprimento, 34.65, largura, 18.56.

Habitat: — Grosso intestino de *Cavia aperea*, Erxl, principalmente no céco E' com *Cyathodinioides piriformis* a especie mais frequentemente observavel, sobretudo sob a forma *furcatum*.

Cyathodinium (Cyathodinium) scotti n. sp.

(Fig. 38)

Corpo de fórma assimetrica, sendo um dos bordos plano ou ligeiramente concavo e outro convexo, o que dá ao ciliado um aspéto encurvado.

O pseudo-peristoma é muito pequeno, reduzido a uma exigua cavidade anterior que se prolonga lateralmente no maximo a cerca de 1/5 do comprimento do corpo.

As linhas de cilios são em numero de 5 aproximadamente.

Macronucleo, micronucleo e vacuolo contrátil, com as caracteristicas do genero.

Dimensões médias: Comprimento, 22.60. Largura, 11.90.

Habitat: — Céco de *Cavia aperea*, Erxl. Mais rara que a precedente.

Cyathodinium (Cyathodinium) pentagonum n. sp.

(Fig. 2)

Corpo de fórma cilindro-conica, com a extremidade anterior obliquamente truncada, o que dá ao ciliado um perfil pentagonal.

A cavidade do pseudo-peristoma, de fórma conica, apresenta na extremidade anterior uma ampla excavação, de diminuta profundidade, porém. Deste modo, a abertura do pseudo-peristoma na face ventral do protozoario, fica reduzida a uma chanfradura de fórma triangular.

Macronucleo, micronucleo e vacuolo contratil, como nas demais espécies do genero.

As linhas de cilios são em numero de 8 aproximadamente.

HABITAT: — Céco de *Cavia aperea*, Erx. Especie rara.

Paracyathodinium n. sub-gen.

Diagnose — Ciliados com os caracteres do genero *Cyathodinium*, sofrendo, porém, durante a reorganisação e divisão, um processo de evaginação do pseudo-peristoma cuja cavidade desaparece inteiramente, acarretando uma profunda alteração na fórma do corpo. Na fase final da divisão, a cisão do plasma tem inicio na extremidade anterior, de modo que os ciliados-filhos, antes de sua separação, sofrem um movimento de rotação em sentidos opostos.

ESPECIE TIPO: — *Cyathodinium* (*Paracyathodinium*) *chagasi*, Cunha e Freitas, 1935.

HABITAT: — Céco de *Cavia aperea*, Erxl. Essa especie é bastante frequente, porém nunca encontrada em grande abundancia.

Cyathodinium (Paracyathodinium) chagasi Cunha e Freitas, 1935

Corpo de fórma conica, apresentando a superficie ligeiramente convexa e terminando posteriormente em ponta.

O pseudo-peristoma apresenta na extremidade anterior, uma abertura relativamente ampla que se prolonga na face ventral por uma fenda larga e de bordas paralelas, que ocupa cerca de 1/4 do comprimento do corpo, terminando posteriormente em semi-circulo.

A ciliatura é constituida por linhas de cilios em numero aproximado de 20. Destas, apenas as 3 ou 4 posteriores dão volta completa na superficie externa do corpo, penetrando as demais na cavidade do pseudo-peristoma, revestindo-o internamente.

O macronucleo é redondo e ocupa a parte média do corpo.

O micronucleo, bastante volumoso, é formado de uma massa esférica fortemente cromofila, cercada de um halo claro. Por vêses o micronucleo apresenta a estrutura tipica de um nucleo vesiculoso, deixando vêr nestes casos uma nitida membrana nuclear que limita o halo, e na qual são por vêses perceptiveis pequenos granulos de cromatina. Nesta especie, o micronucleo fica quasi sempre afastado do macronucleo.

O vacuolo contratil, situado pouco atrás do macronucleo, não apresenta nenhum carater importante.

Tanto a placa semi-lunar como os ciatostilos são bem desenvolvidas, sendo mesmo nesta espécie que melhor se evidenciam tais organelas.

Dimensões médias: Comprimento, 53.67. Largura, 21.95.

Os cistos são ovais e mostram no seu interior um macronucleo e um micronucleo com estrutura semelhante á das fórmas neutras, bem como uma ciliatura interna.

Os quistos medem cerca de 34 mm. de comprimento por 27 mm. de largura, sendo a relação comprimento/largura de 1.2.

Cyathodinium (Paracyathodinium) breve n. sp.

Corpo conico, de bordas convexas, terminando posteriormente em ponta. Pela fórma do corpo, esta espécie se assemelha á precedente, sendo, porém, além de muito menor, relativamente mais curta, levando em conta a relação comprimento/largura.

O pseudo-peristoma se assemelha ao do *C. chagasi,* sendo, porém, em relação ao comprimento do corpo, muito mais desenvolvido.

As linhas de cilios são em numero de 5 aproximadamente.

Macronucleo, micronucleo, e vacuolo contratil como nas demais espécies do genero.

Dimensões médias: Comprimento, 21.71. Largura, 13.85.

Habitat: — Céco de *Cavia aperea*, Erxl. Pouco frequente, ocorrendo em grande numero.

Genero **Cyathodinioides** Cunha e Freitas, 1936

Syn. *Cyathodinium pro parte* Cunha, 1914

Cyathodinium pro parte Scott, 1932

Diagnose — Corpo de fórma arredondada, achatado lateralmente. Pseudo-peristoma formado por profunda escavação cuja abertura ocupa quasi toda a extremidade anterior, prolongando-se na face ventral cerca de 2/3 de seu comprimento. Labio esquerdo do pseudo-peristoma dotado de organelas de sustentação (chilostilos). Ausencia de *cyathostilos* e da placa cromofila semi-lunar. Linhas de cilios obliquas. Macronucleo e micronucleo como no genero *Cyathodinium*. Vacuolo contractil, unico ou multiplo. A divisão efetua-se por plano obliquo, perpendicular ás linhas de cilios. Durante a reorganisação os restos da divisão do micronucleo sofrem degeneração macronucleiforme que termina, bem como a degeneração do macronucleo, por desagregação em granulos.

Cyathodinioides piriformis (Cunha, 1914)

Syn. *Cyathodinium piriforme* Cunha, 1914

Cyathodinium piriforme, pro parte, Scott, 1932

(Fig. 3)

O corpo, visto lateralmente, apresenta um perfil arredondado, sendo que na extremidade posterior se observa um prolongamento curto, largo, com extre-

midade arredondada, dirigindo-se para trás e para a face dorsal. O pseudo-peristoma é formado por uma cavidade profunda que ocupa cerca da metade da largura do corpo e cuja abertura, iniciando-se na extremidade anterior, se prolonga na face ventral cerca de 2/3 do comprimento do corpo. No labio esquerdo do pseudo-peristoma observam-se os chilostilos, dispostos em série linear em sentido longitudinal e em numero que variam de 6 a 12. As linhas de cilios, dispostas obliquamente de deante para trás e da face dorsal para a ventral, são em numero de 11. O macronucleo, geralmente redondo, ás vêses alongado, fica situado no lado dorsal um pouco para trás da linha mediana. O micronucleo é volumoso e está colocado proximo ao macronucleo. O vacuolo contractil unico fica colocado próximo á face dorsal, posteriormente ao macronucleo.

Dimensões médias: Comprimento, 33.25. Largura, 18.67.

Habitat: — Grosso intestino de *Cavia aperea* onde é, com o *Cyathodinium conicum*, a especie que se encontra com mais frequencia. Tambem se encontra na cobaia.

Cyathodinioides vesiculosus (Cunha, 1914)

Syn. *Cyathodinium vesiculosum* Cunha, 1914

(Fig. 40)

Corpo de fórma ovalar, achatado no sentido lateral e com a extremidade posterior arredondada desprovida do prolongamento existente nas outras espécies. O pseudo-peristoma é muito desenvolvido, ocupando a maior parte do corpo do ciliado. Os chilostilos são numerosos e acham-se dispostos no labio esquerdo de maneira compacta em uma zona de fórma triangular de base posterior, havendo ainda chilostilos esparsos em toda a extensão do labio. As linhas de cilios muito numerosas são aproximadamente de 40-45.

A determinação do numero exato de linha de cilios é muito dificil nesta espécie e na seguinte, já por seu numero elevado como pelo fato de no genero *Cyathodinioides* serem os cilios dispostos de maneira mais compacta que no genero *Cyathodinium* e apresentarem os corpusculos basais menores dimensões. O macronucleo é alongado e fica situado na metade posterior do corpo junto á face dorsal. Micronucleo volumoso, junto ao macronucleo. Os vacuolos contracteis são em numero de 5 a 6 colocados entre o macronucleo e a face dorsal.

Dimensões médias: Comprimento, 58.24. Largura, 54.60.

Habitat: — Grosso intestino de *Cavia aperea*. Menos frequente que a precedente.

Cyathodinioides intermedius n. sp.

O corpo apresenta fórma semelhante ao do *Cyathodinioides piriformis* e mostra tambem um prolongamento curto e rombo da parte postero-dorsal, di-

Quadro

Biometria

	Comprimento			Largura			Relação C/Z		
	Max.	Min.	Méd.	Max.	Min.	Méd.	Max.	Min.	Méd.
Cyathodinium chagasi	75.00	36.00	53.67	27.00	15.00	21.95	2.9	1.6	2.4
C. conicum (F. furcatum)	38.57	27.00	34.65	21.28	13.96	18.56	1.9	1.6	1.8
C. pentagonum	31.00	23.00	26.90	15 00	12.00	13.10	2.3	1.9	2.0
C. scotti	29.92	15.96	22.60	13.30	7.98	11.90	2.7	1.0	2.0
C. breve	26.60	18.62	21.71	17.29	11.97	13.85	1.7	1.5	1.6
Cyathodinioides piriforme	33.25	18.62	28.46	23.94	7.98	18 67	1.2	2.3	1.5
Cyathodinirides intermedrius	59.85	33.25	46.55	45.22	19.95	32.58	1.6	1.3	1.4
Cyathodinioides vesiculosus	94.64	58.24	72.80	89.18	54.60	66.30	1.2	1.0	1.1
Cyathodinioides parvus	15.96	11.97	13.83	10.64	9.31	9.57	1.7	1.3	1.4

fere porém deste, por ser de maiores dimensões, constituindo assim um intermediario entre as espécies precedentes.

Os *chilostylos* se dispõem de maneira semelhante aos do *C. vesiculosus,* sendo, porém, geralmente menos numerosos.

As linhas de cilios são em numero aproximado de 20.

O macronucleo é geralmente alongado e disposto na metade posterior do corpo junto á face dorsal. Micronucleo volumoso, junto ao macronucleo. Os vacuolos contracteis, em numero de 3 a 4, ficam colocados entre o macronucleo e a face dorsal.

Dimensões médias: Comprimento, 33.25. Largura, 19.95.

HABITAT: — Grosso intestino de *Cavia aperea.* E' especie rara.

Cyathodinioides parvus n. sp.

(Fig. 42)

Essa espécie apresenta fórma bastante variavel, mostrando-se ás veses arredondada com a extremidade posterior mais estreita, outras veses de fórma cilindro conica. A cavidade do pseudo-peristoma é relativamente pouco profunda e se prolonga apenas cerca da metade do comprimento do corpo. Esses caracteres fazem com que esta espécie, pela sua morfologia, constitua intermediario entre os dois generos, tornando á primeira vista dificil a sua inclusão em um deles. Um exame, porém, mais cuidadoso do material, permitiu a observação de fórmas de divisão como as representadas nas figs. 13 e 14 que mostra claramente que o processo de divisão nesse ciliado se faz de maneira identica ao do genero *Cyathodinioides.* Além disso, fórmas foram observadas em via de reorganisação nuclear nas quais se observava a degeneração macronucleiforme dos restos da divisão do micronucleo, o que exclue qualquer duvida que ainda pudesse subsistir sobre o assumpto.

Nos preparados que possuimos não foi possivel determinar com segurança a existencia de *chilostylos,* algumas fórmas, porém, faziam suspeitar da existencia de 3 a 4 dessas organelas.

Linhas de cilios em numero de 4 a 5.

Macronucleo quasi sempre ligeiramente alongado.

Micronucleo muito volumoso, junto ao macronucleo.

Dimensões médias: Comprimento, 33.25. Largura, 19.95.

HABITAT: — Grosso intestino de *Cavia aperea.* Especie rara.

VII) PARASITAS DOS *CYATHODINIIDAE*

Observa-se algumas vêses nesses ciliados, a presença de formações no citoplasma das quais não tivemos oportunidade de tratar e que passamos a descrever.

Essas inclusões têm fórma de placas delgadas que, vistas de face, apresentam contorno circular, eliptico ou oval, sendo que nesse ultimo caso, a extremidade mais delgada termina em ponta; vistas de perfil

apresentam aspéto baciliforme.. Elas se dispõem na parte periferica do endoplasma, logo abaixo da membrana celular com o plano das plaquetas paralelo a essa membrana. Devido a essa colocação, quando se focalisa ao microscopio a superficie do ciliado, elas se apresentam de face, ao passo que, focalisando a parte média, são vistas de perfil. A parte central do citoplasma se mostra sempre livre dessas inclusões. Em preparados corados se coram pela hematoxilina-ferrea, porém com menor intensidade que a cromatina, quando vista de face. A coloração, nesse caso, é geralmente uniforme, exceto nas plaquetas ovais em que as bordas que limitam a extremidade mais fina se mostram mais intensamente coradas. Vistas de perfil elas apresentam-se intensamente coradas. Essas inclusões foram observadas até agora no *Cyathodinium scotti, C. pentagonum* e *Cyathodinioides piriformis.*

Quanto á sua ocorrencia queremos chamar a atenção para dois fatos. O primeiro é que, quando essas inclusões são observadas em dada especie, a grande maioria de exemplares dessa especie provenientes do mesmo hospedeiro, mostra a presença dessas inclusões, sendo por vêses dificil encontrar no mesmo material exemplares que as não contenham, entretanto ciliados da mesma especie provenientes de outros hospedeiros, se mostram completamente livres dessas inclusões. Assim as referidas formações ou existem em grande numero de individuos da mesma proveniencia ou faltam completamente. Por outro lado a presença dessas inclusões não está em relação com nenhuma face do ciclo evolutivo do ciliado.

Além disso, não encontramos em outros protozoarios organelas ou estruturas protoplasmaticas com as quais pudessemos homologal-as. Por isso julgamos mais acertado consideral-as como de natureza parasitaria.

Não encontramos entre os parasitos dos protozoarios até agora conhecidos, nenhum com que pudessemos identifical-os.

Elas apresentam entretanto certa semelhança com os parasitos (peg-formed parasite) descritos por Kirby na *Trichonympha campanula* e *T. nevadensis.*

VIII) DISCUSSÃO

No presente capitulo faremos algumas considerações sobre os *Cyathodiniidae,* sua morfologia e evolução, procurando interpretar os fenomenos que neles se processam bem como discutir sua posição sistematica e filogenia.

Sob o ponto de vista morfologico o primeiro fato a assinalar é a existencia nos ciliados dessa familia de duplicidade nuclear nitida, constituindo mesmo pelas dimensões do micronucleo e posição destacada

ocupada por este em relação ao macronucleo, ótimo material para demonstração dessa propriedade.

No genero *Cyathodinium* é sempre facil verificar esse fato, o mesmo acontecendo, na maior parte das vêses, com o genero *Cyathodinioides*. Sómente em certas fases da evolução deste ultimo genero, quando o plasma se enche de granulos cromaticos provenientes da desagregação do macronucleo e dos restos de divisão do micronucleo, é que se torna por vêses dificil caracterisar essa organela. Convém assinalar, porém, que é sobretudo no genero Enterophrya, confundida por Scott com *Cyathodinioides* que mais frequentemente se verifica esse fato.

Mas, não só morfologicamente se evidencia a duplicidade nuclear dos *Cyathodinidae,* pois, conforme teremos ocasião de referir, tambem nas diversas fases de evolução desses ciliados, o macronucleo e micronucleo não tem comportamento diverso do das mesmas organelas de outros ciliados.

A existencia de uma profunda cavidade semelhante ao peristoma de outros ciliados é tomado como tal pelos primeiros observadores, constitue um caráter morfologico que está em contradição com os dados fornecidos pelo estudo da nutrição desses protozoarios que, como vimos, se faz por ormose através á membrana celular e não por ingestão de particulas solidas. Entretanto, a existencia dessa cavidade póde ser explicada como representando um antigo peristoma cujas funções desapareceram pela obstrução da boca primitivamente colocada no fundo dessa cavidade. E' possivel mesmo que o *catostilo* que se encontra no genero *Cyathodinium* representa o reliquat do faringe obstruido.

Relativamente á biologia dos *Cyathodinidae,* o primeiro fato para o qual queremos chamar atenção é a inexistencia no ciclo evolutivo desses ciliados, do dimorfismo admitido por Scott Lucas em seu trabalho sobre o *Cyathodinioides piriformis*. Segundo Scott, apresentaria essa especie duas fórmas; uma, fórma *A*, dotada da cavidade do pseudo-peristoma, outra, fórma *B,* desprovida dessa cavidade.

Sómente essa ultima seria capaz de se dividir e reorganisar, de maneira que, antes da ocurrencia desses fenomenos, a fórma *A* se transformaria na fórma *B* que, após a realisação do ato, iria reproduzir a fórma *A*.

Em nossas pesquisas, encontramos repetidas vêses individuos do *Cyathodinioides piriformis* em via de divisão ou de reorganisação que conservavam, entretanto, a fórma tipica da especie, apenas com perda dos cilios e redução da profundidade da cavidade do pseudo-peristoma que contudo nunca deixava de ser nitidamente visivel (Ests. 2, 5 e 7, figs. 11, 33 e 52). Igual fato foi tambem observado em outra especie do genero, o

Cyathodinioides parvus (Est. 2, fig. 13). Ocorre ainda que nunca foi possivel encontrar ciliado algum, que por suas dimensões e morfologia, pudesse ser considerado como fórma *B*, de qualquer uma das demais especies observadas, quer do genero *Cyathodinioides*, quer do genero *Cyathodinium*. Por outro lado, fórmas em divisão ou reorganisação foram observadas em quasi todas as especies, sem que elas demonstrassem profundas modificações morfologicas que permitissem consideral-as como uma fórma *B*.

Ocorre ainda que a descrição dada por Scott Lucas á fórma *B* do *Cyathodinioides piriformis* permite identifical-a ao ciliado descrito por Hasselmann sob o nome de *Enterophrya piriformis*.

Ora, além dessa especie, Hasselmann descreveu uma outra do mesmo genero, a *Enterophrya elongata* e, em nossas pesquisas, a existencia de uma terceira especie foi verificada, sem que a nenhuma dessas especies corresponda uma fórma *A* dotada de pseudo-peristoma. Temos assim, de um lado ciliados dotados de pseudo-peristoma (*Cyathodinium* e *Cyathodinioides*) de outro ciliados sem pseudo-peristoma e sómente no caso de *Cyathodinioides piriformis* e da *Enterophrya piriformis* é possivel pelas dimensões e morfologia dos ciliados considerar a possibilidade de ser um deles uma fórma de evolução do outro. Aliás esse dimorfismo não encontraria justificativa, pois, todos esses ciliados são capazes de multiplicação e reorganisação sem perda da fórma tipica. Do que ficou dito, se póde concluir da inexistencia de dimorfismo no ciclo evolutivo dos *Cyathodiniidae*.

Passemos agora em revista as principais caracteristicas observadas no ciclo vital desses Protozoarios. Durante a divisão dois fatos ocorrem peculiares a essa familia. Primeiro, o plano de divisão é longitudinal (*Cyathodinium*) ou obliquo (*Cyathodinioides*), ao contrario dos demais ciliados onde a divisão é transversal, segundo a perda dos cilios e formação endogena de duas novas ciliaturas. A divisão longitudinal foi assinalada até agora uma unica vês. Trata-se do *Tropidoatractus acuminatus* que segundo Baumeister, se dividiria longitudinalmente. As figuras do autor, porém, não são convincentes, parecendo tratar-se antes de fórmas em conjugação.

Si adotarmos as idéias de Chatton e Lwoff de que a divisão nos ciliados se faz perpendicularmente ás linhas de cilios ou das *cinetias*, então a divisão longitudinal nos *Cyathodiniidae* seria antes uma confirmação do que uma excepção á regra geral. Constituem assim os ciliados dessa familia um belo exemplo em favor das idéais sobre a ciliatura sustentadas por esses autores.

Quanto á perda dos cilios e formação endogena de novas ciliaturas, não encontramos similar em nenhum outro ciliado. E' verdade que

Wallengren e Griffin, durante a divisão dos *Hypotricha*, observaram a substituição dos cilios por outros néoformados e Mac Dougall (1925) assinala o desaparecimento da boca e do citofaringe juntamente com os cilios e néoformação de novas organelas dessa natureza durante a divisão do *Chilodon uncinatus*. Essas observações são de molde a diminuir a distancia que separa o modo de se comportar do *Cyathodiniidae* e o dos demais ciliados.

Quanto ao processo de reorganisação é fóra de duvida que o fenomeno de conjugação póde ser excluido. Observações cuidadosas, por longo tempo, em material proveniente de grande numero de preás, nunca revelou a existencia de um unico par constituido por ciliados dessa familia. Por outro lado a evolução completa do fenomeno de endomixia poude ser acompanhada em detalhe, processando-se de maneira semelhante á já verificada em outros ciliados, apenas diferindo pela perda de cilios e formação endogena de novas ciliaturas.

O fenomeno de endomixia é bem conhecido. Foi descrito pela primeira vês por Woodruff e Erdmann no *Paramecium caudatum* conservado em cultura, tendo o cuidado de separar os ciliados recem-divididos. Posteriormente foi esse fenomeno estudado em outros ciliados onde ele ocorre expontaneamente nas fórmas enquistadas. A ocurrencia expontanea de endomixia em ciliados livres, isto é, não enquistados, foi pela primeira vês observada no *Balantidium simile* por Cunha e Muniz. Aqui o fenomeno se processa independentemente de qualquer causa mecanica que impeça a união dos dois conjugantes. Poder-se-ia pensar na existencia de qualquer causa de natureza fisica ou fisico-quimica no conteúdo intestinal que impedisse a união dos dois conjugantes. Entretanto cultivando o *Balantidium* simile nos meios apropriados, este, ao contrario de outras especies que conjugam 24 a 48 horas depois, não conjuga, sendo que em preparados corados póde-se verificar que esse fenomeno é substituido pela endomixia. Trata-se pois no caso do *Balantidium simile* de um ciliado em que o fenomeno de conjugação é substituido de maneira permanente pela endomixia. Cunha e Muniz propuzeram para esses ciliados a denominação de « Ciliados azigoticos ou partenogeneticos ». E' esse o fenomeno que se observa no *Cyathodiniidae,* constituindo assim essa familia um exemplo tipico de ciliados azigoticos.

O decurso do fenomeno não difere em essencia do que ocorre em outros ciliados. O micronucleo sofre duas mitoses sucessivas que dão logar á formação de 4 nucleos, tres desses degeneram, enquanto o restante, por meio de uma terceira mitose, vae formar o novo micronucleo e a placenta que se transformará depois no macronucleo. As mitoses

tambem não diferem das observadas em outros ciliados, sendo os cromosomas bastante numerosos, o que impede a sua contagem. Nessas mitoses, observa-se quasi sempre a presença no interior do nucleo de dois centriolos ligados por uma centrodesmose indicando a existencia de um centro cinetico intranuclear. Esse fato é particularmente nitido na fig. 9 da est. 2.

No genero *Cyathodinium*, esses fenomenos se observam sem dificuldade. Já no genero *Cyathodinioides* a observação é perturbada pelo aparecimento de aspetos estranhos que entretanto se esclarecem completamente, levando em conta o processo por que se dá a degeneração dos restos de divisão do micronucleo e do macronucleo. A degeneração dos restos de divisão do micronucleo se faz por um processo semelhante ao já observado por Ivanic durante a reorganisação das fórmas enquistadas do *Chilodon uncinatus* e que esse autor denominou de degeneração macronucleiforme. Esses restos bem como o macronucleo se desagregam posteriormente em granulos que se espalham pelo plasma. No fundo, porém, o processo é identico ao observado no *Cyathodinium*.

Quanto á significação da degeneração macronucleiforme, se afasta o nosso modo de vêr do de Ivanic. Esse autor encara a degeneração macronucleiforme como um argumento em favor da hipótese por ele aventada de ser essa organela um nucleo em degeneração. Evidentemente, a existencia de fórmas amicronucleadas encontradas em diversos ciliados capazes entretanto de se dividir por numerosas gerações, constitue poderoso argumento contra as idéias do autor. Além disso, a degeneração macronucleiforme póde encontrar outra explicação, a de representar ela uma evolução abortada á semelhança da formação de arcos branquiais no embrião dos mamiferos terrestres.

Do que ficou exposto se póde concluir que os *Cyathodiniidae* apresentam as principais caracteristicas dos ciliados, apenas se afastando dos demais por certas particularidades, insuficientes, porém, para impedir a sua inclusão nesse grupo de Protozoarios.

Os caracteres especiais observados nessa familia, não são de molde, a nosso vêr, a trazer esclarecimentos para o problema de filogenia dos ciliados.

Os *Cyathodiniidae* são ciliados modificados pela adaptação á vida parasitaria; não é logico, assim, procurar no estudo desse grupo, explicações sobre a origem filogenetica dos ciliados, que devem de preferencia ser pesquisados entre os Protozoarios de vida livre.

A familia *Cyathodiniidae*, em vista dos caracteres apresentados, deve ser incluida na ordem *Holotricha*, sub-ordem *Astomatea*.

Quanto ás afinidades que possa apresentar com outros ciliados, é a familia *Enterophrydae* a que mais dela se aproxima. A unica especie

dessa familia conhecida sob o ponto de vista de sua morfologia e biologia, a *Enterophrya piriformis,* demonstra claramente o estreito parentesco existente entre elas. Si esse parentesco se estende a toda familia, é no momento impossivel decidir, sendo de esperar contudo que isso se dê, levando em conta a grande semelhança morfologica apresentada pelos ciliados desse grupo. As afinidades existentes entre as duas familias, porém, não esclarecem a posição dos *Cyathodiniidae* entre os demais ciliados, pois a familia *Enterophrydae,* pelos seus caracteres especiais, não estabelece qualquer ligação entre os *Cyathodiniidae* e as outras familias.

IX) RESUMO E CONCLUSÕES

1) Os *Cyathodiniidae* são ciliados caracterisados morfologicamente pela existencia de uma escavação de abertura antero-ventral, o *pseudo-peristoma.* A ciliatura é constituida por cilios uniformes dispostos em linhas transversas ou obliquas que revestem a parte externa do corpo situado ao nivel do pseudo-peristoma onde penetram para revestir a superficie interna deste.

Os *Cyathodiniidae* apresentam duplicidade nuclear nitida, que se manifesta morfologica e funcionalmente.

2) Os *Cyathodiniidae* não possuem boca e sua nutrição se faz por ormose através a membrana celular.

3) Os *Cyathodiniidae* se multiplicam por divisão binaria que é acompanhada da perda dos cilios e formação endogena de duas novas ciliaturas. O plano de divisão é longitudinal ou obliquo, isto é, se faz de acordo com as idéias de Chatton e Lwoff perpendicularmente á direção das cinetias.

4) A reorganisação se faz exclusivamente por endomixia que é acompanhada da perda dos cilios e formação endogena da nova ciliatura.

5) A endomixia se passa em individuos que, quer pela sua morfologia, quer pelas dimensões, não diferem das fórmas neutras.

6) No processo de endomixia o micronucleo por meio de duas mitoses sucessivas forma 4 nucleos, 3 dos quais degeneram, enquanto o restante vae formar por divisão o novo micronucleo e a placenta que se transforma posteriormente no novo macronucleo.

7) O processo é identico nos dois generos em que se sub-divide a familia, diferindo apenas no modo por que se dá a degeneração do macronucleo e dos restos da divisão do micronucleo.

8) Enquanto no genero *Cyathodinium* a degeneração se faz por picnose, no genero *Cyathodinioides*, o macronucleo degenera por desagregação em granulos e os restos de divisão do micronucleo, pelo processo de degeneração macronucleiforme descrito por Ivanic, terminando tambem por desagregação em granulos.

9) A degeneração macronucleiforme deve ser interpretada como uma evolução abortada e não como prova de ser o macronucleo uma organela em degeneração, como pensa Ivanic.

10) Os *Cyathodiniidae* se transmitem por meio de quistos

11) Os *Cyathodiniidae* devem ser considerados como ciliados dos quais apresentam os principais caracteres. São ciliados modificados pela vida parasitaria e seu estudo é improprio para esclarecer a filogenia desse grupo.

12) Os *Cyathodiniidae* devem ser incluidos na ordem *Holotrica*, subordem *Astomatea*.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

1) *Cyathodiniidae* are ciliates morphologically characterized by the presence of a depression antero-ventrally opened, the *pseudo-peristoma*. Ciliation is represented by uniform cilia, arranged in transverse or oblique lines, inserted both on the external surface of the pseudo-peristoma, and on its internal surface. The *Cyathodiniidae* show clear nucleous duplicity, morphologically and functionally manifested.

2) The *Cyathodiniidae*, have not mouth and its nutrition is accomplished by osmose through a cellular membrane.

3) The *Cyathodiniidae* multiply by binary fission accompanied by lost of cilia and endogenous formation of two new ciliations, the plane of division is longitudinal or oblique or, according to the ideas of Chatton and Lwoff, perpendicularly to the cinetia direction.

4) Reorganisation is accomplished by endomixis which is accompanied by lost of cilia and endogenous formation of a new ciliature.

5) Endomixis is observed in individuals not differing from the neutral forms in its morphology and dimensions.

6) In the endomixis process the micronucleus, after 2 successive mitoses, form 4 nuclei, 3 of which degenerate, and the remaining forming, by division, a new micronucleus and the placenta which transform itself in a new macronucleus.

7) The process, in both genera forming the family, is identical, only differing in the way of the degeneration of macronucleus and of the remains of the division of micronucleus.

8) Though in *Cyathodinium* the degeneration results from a picnose, in *Cyathodinioides* macronucleus and remains of micronucleus fision degenerate by disaggregation in granules, through the process of macronucleiform degeneration described by Ivanic.

9) Degeneration macronucleiform must be interpreted as an aborted evolution and not, as Ivanic suggests, an evidence of macronucleus being an organ in degeneration.

10) *Cyathodiniidae* are transmitted by cyst.

11) *Cyathodiniidae* must be considered as true Ciliates modified by parasite life, whose study must not be considered for the explanation of the phylogeny of this group.

12) *Cyathodiniidae* must be included in Order *Holotrica*, sub-order *Astomatea*.

X) BIBLIOGRAFIA CITADA

Baumeister, Willi

1932. Arch. f. Protistenkunden, **77** : 360-378.

Chatton, E. & Lwoff, A.

1935. Les Ciliés Apostomes. Arch. Zool. Exp. & Gen., **77** (1).

Cleveland, L. R., Hall, S. R., Sanders, E. P. & Collier, J.

1934. The wood-feeding roach *Cryptocercus*, its Protozoa and symbiosis between Protozoa and roach. Mem. Acad. Arts. & Sciences, Boston, **17**.

Cunha, A. M. da

1914. Sobre os Ciliados intestinais dos Mamiferos. Mem. Inst. Osw. Cruz, **6**.

Cunha, A. M. da & Freitas, G.

1936. Division et Reorganisation chez les Ciliés de la famille des Cyathodiniidae. I. C. Rend. Soc. Biol., **123** : 436.

1936. Ibid. II. C. Rend. Soc. Biol., **123** : 711.

Fantham, H. B.

1925. Some parasitic Protozoa found in South Africa. VIII. South Africa J. Sc., **22** : 346.

Cunha, A. M. da & Muniz, J.

1930. Divisão longitudinal em um Ciliado (*Cyathodinium conicum*). Rev. Med. Cir. do Brasil, **28**.

Hasselmann, G.

1926. Contribuição para o estudo dos Ciliados intestinais dos Mamiferos. Bul. Inst. Bras. de Sc., **2** (3).

Ivanic, M.

1928. Ueber die mit den parthenogenestischen Reorganisationsprozessen des Kernapparates verbundenen Vermehrungscysten von *Chilodon uncinatus*, Ehrbg. (Zugleich ein Beitrag zur kentnis der promitotischen Kernteilung bei Infusorien). Arch. f. Protistenk., **6**.

Kirby, H. Jr.

Flagellates of the genus *Trichonympha* in the termites. Un. Cal. Publ. Zool., **37** (15).

Lucas, M. S.

1932. A study of *Cyathodinium piriforme*. Arch. f. Protistenk, **77**.

1932 *a*. The cytoplasmic phases of rejuvenescence and fission in *Cyathodunium piriforme*. Arch. f. Protistenk., **77**.

Kidder, G. W.

1929. Streblomastix strix, morphology and mitosis. Un. Cal. Publ. Zool., **33**.

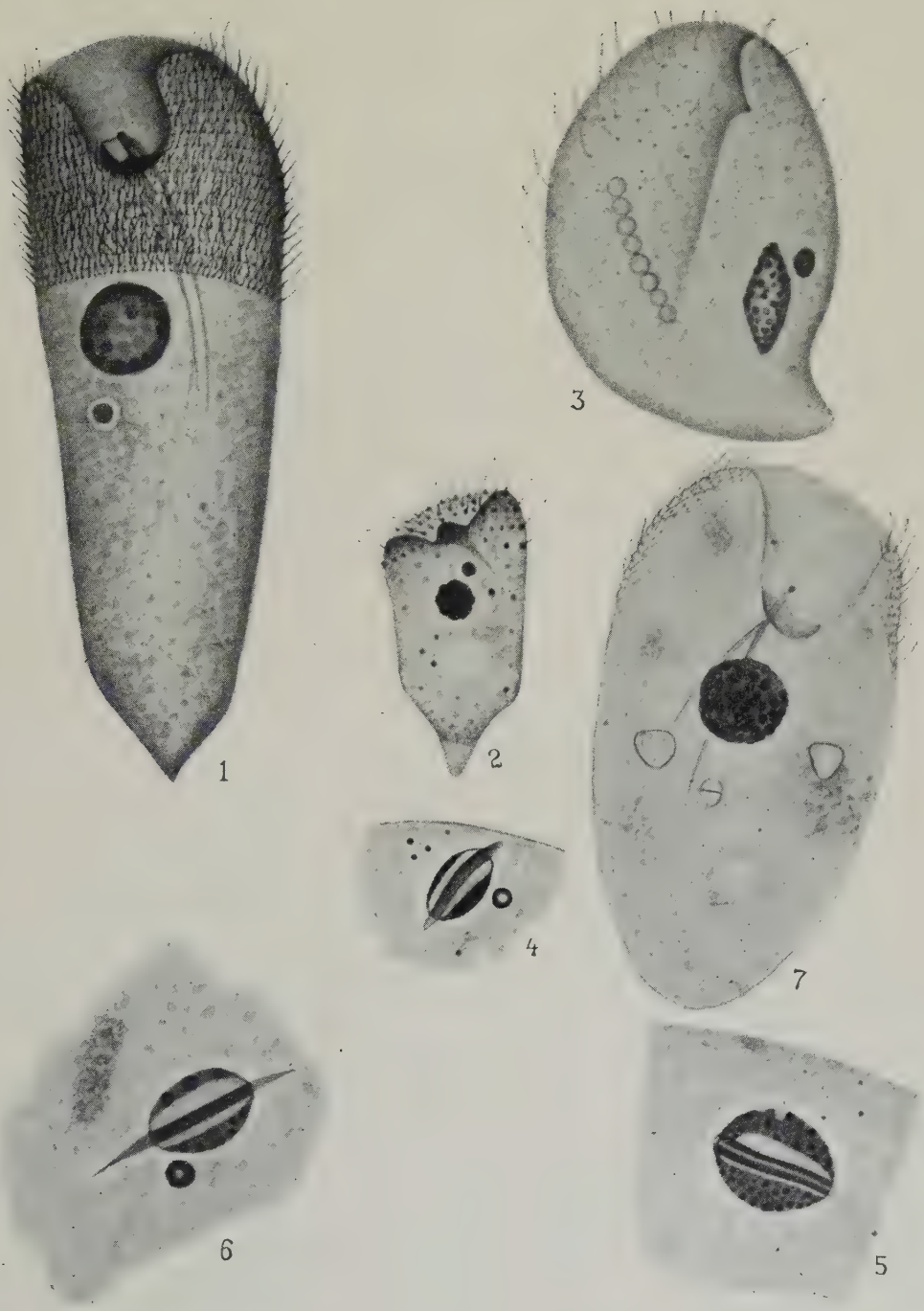
Mesnil, F.

1932. *In* Bul. Inst. Past., **30** : 1177.

Estampa 1

(desenhos)

Fig. 1 — *Cyathodinium chagasi,* fórma neutra.
Fig. 2 — *Cyathodinium pentagonum,* fórma neutra.
Fig. 3 — *Cyathodinioides piriformis,* fórma neutra.
Figs. 4, 5 e 6 — Macronucleo com cristaloide.
Fig. 7 — *Cyathodinium chagasi,* fórma inicial de divisão.



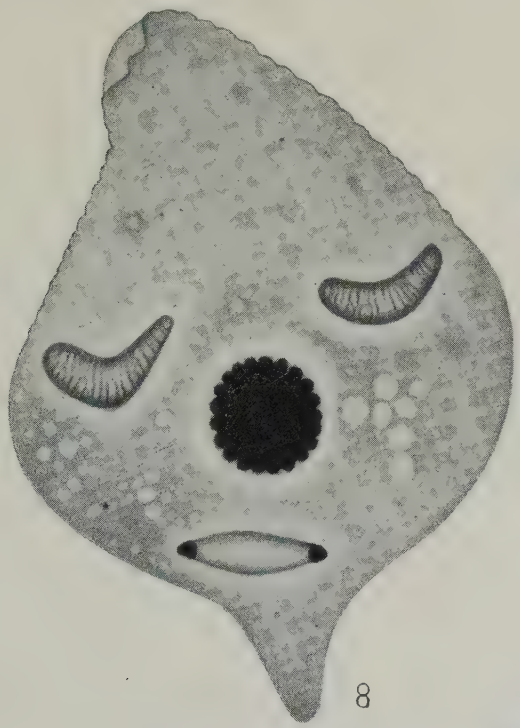
Freitas e Campos da Paz, del.

Cunha e Freitas: *Cyathodiniidae.*

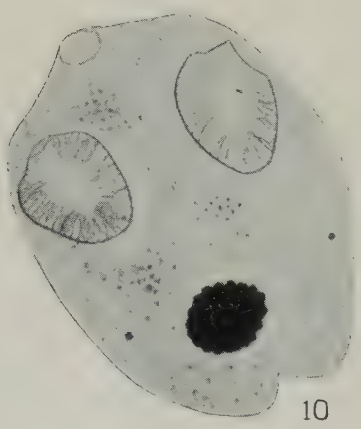
Estampa 2

(desenhos)

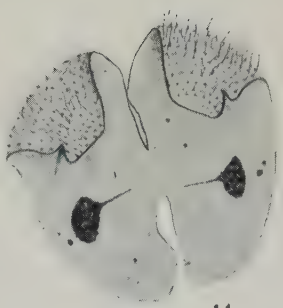
Fig. 8 — *Cyathodinium chagasi,* fórma de divisão.
Fig. 9 — *Cyathodinium chagasi,* fórma de divisão em fase mais adiantada.
Fig. 10 — *Cyathodinium conicum,* fórma de divisão.
Fig. 11 — *Cyathodinium conicum,* fórma final de divisão.
Fig. 12 — *Cyathodinioides piriformis,* fórma de divisão.
Fig. 13 — *Cyathodinioides parvus,* fórma de divisão.
Fig. 14 — *Cyathodinioides parvus,* fórma final de divisão.



8



10

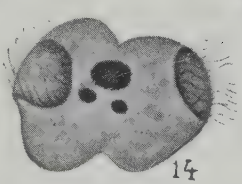


11

13

9

12



14

Freitas e Campos da Paz, del.

Cunha e Freitas: *Cyathodiniidae.*

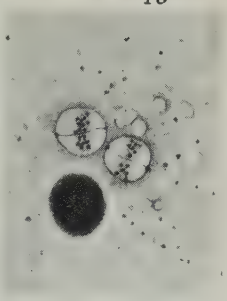
Estampa 3

(desenhos)

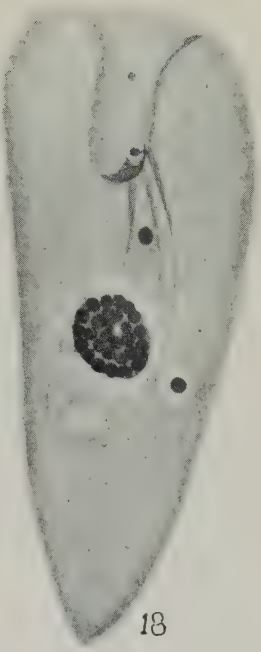
Fig. 15 — *Cyathodinium conicum*, fase inicial de reorganisação com o micronucleo em mitose.
Fig. 16 — Mitose do micronucleo do *Cyathodinium chagasi* em inicio de reorganisação.
Fig. 17 — *Cyathodinium chagasi* com 2 mitoses do micronucleo.
Fig. 18 — *Cyathodinium chagasi* em via de reorganisação e com 2 micronucleos.
Fig. 19 — *Cyathodinium chagasi* em reorganisação com 4 micronucleos.
Fig. 20 — *Cyathodinium chagasi* em reorganisação com uma mitose para formação do novo micronucleo e da placenta e 3 restos em degeneração.
Fig. 21 — *Cyathodinium breve* em reorganisação com uma mitose e 3 restos.

15

16

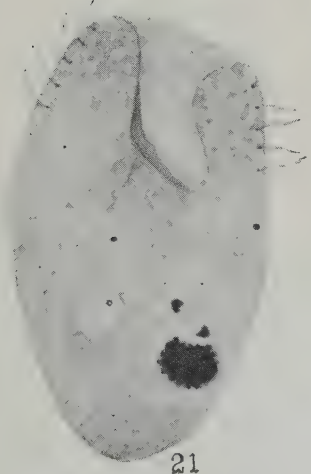


17

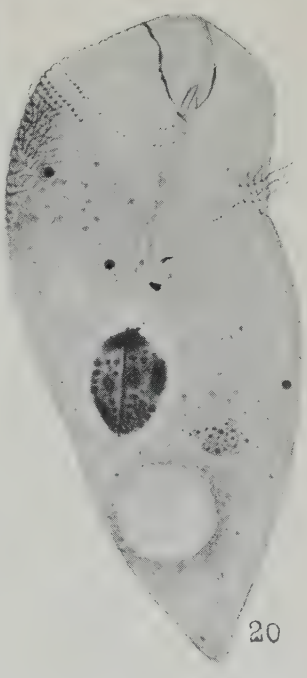


18

19



21



20

Freitas e Campos da Paz, del.

Cunha e Freitas: *Cyathodiniidae.*

Estampa 4

(desenhos)

Fig. 22 — *Cyathodinium chagasi* em reorganisação com macronucleo, micronucleo e placenta recenformados e 3 restos.

Fig. 23 — *Cyathodinium chagasi* em reorganisação com macronucleo recenformado, micronucleo e o antigo macronucleo em adeantada degeneração por picnose.

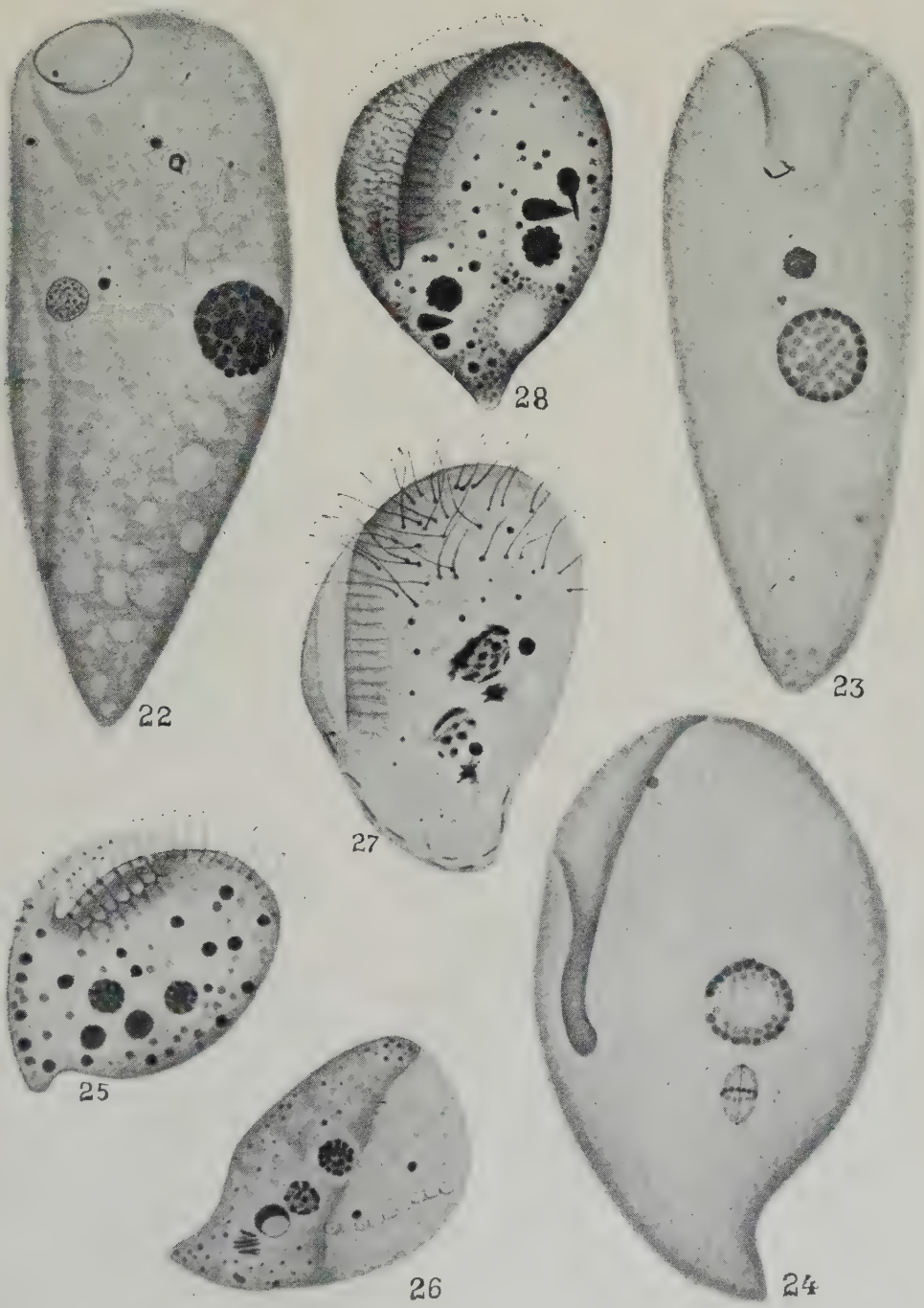
Fig. 24 — *Cyathodinioides piriformis* em fase inicial de reorganisação com micronucleo em mitose.

Fig 25 — *Cyathodinioides piriformis* em reorganisação com macronucleo e 3 restos em via de degeneração macronucleiforme, sendo um maior e 2 menores.

Fig. 26 — *Cyathodinioides piriformis* em reorganisação com macronucleo, 3 restos em degeneração macronucleiforme e o micronucleo em fase final de divisão para formação do novo micronucleo e da placenta.

Fig. 27 — *Cyathodinioides piriformis* em reorganisação com macronucleo e 3 restos em degeneração macronucleiforme, sendo 2 em estado avançado de desagregação. Micronucleo já dividido.

Fig. 28 — *Cyathodinioides piriformis* em reorganisação com macronucleo, micronucleo, placenta e 3 restos em degeneração macronucleiforme. Aspéto anomalo dos restos.



Freitas e Campos da Paz, del.

Cunha e Freitas: *Cyathodiniidae.*

Estampa 5

(desenhos)

Fig. 29 — *Cyathodinioides piriformis* em reorganisação com macronucleo, micronucleo já dividido e 2 restos, o terceiro resto, já desagregado é representado pelos granulos cromofilos existentes no plasma.

Fig. 30 — *Cyathodinium chagasi* em reorganisação ciliar. Na parte posterior da nova ciliatura observa-se os *cyathostilos* neoformados.

Fig. 31 — *Cyathodinium breve* em reorganisação ciliar.

Fig. 32 — *Cyathodinium breve* em reorganisação ciliar. Notar a persistencia do macronucleo.

Fig. 33 — *Cyathodinioides piriformis* em reorganisação ciliar. Notar junto á nova ciliatura, os *chilostylos* neoformados.

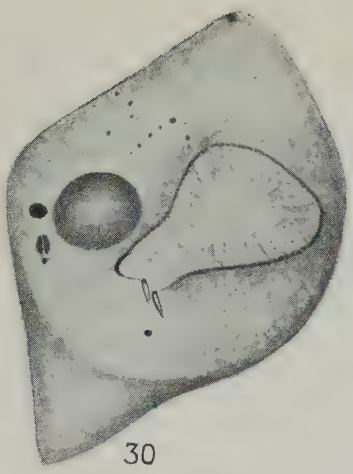
Fig. 34 — *Cyathodinioides piriformis* em reorganisação ciliar. Ciliatura interna em via de evaginação.

Fig. 35 — *Cyathodinium chagasi* — Quisto.

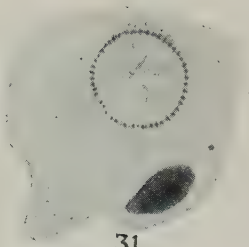
Fig. 36 — *Cyathodinium conicum,* fórma neutra. Pseudo-peristoma dilatado.

Fig 37 — *Cyathodinium conicum,* fórma neutra. Pseudo-peristoma retraído.

29



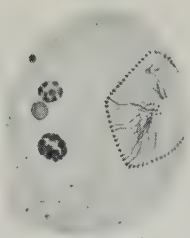
30



31

32

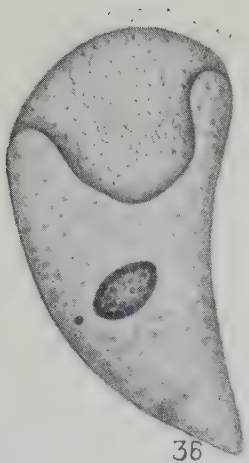
33



34

37

35



36

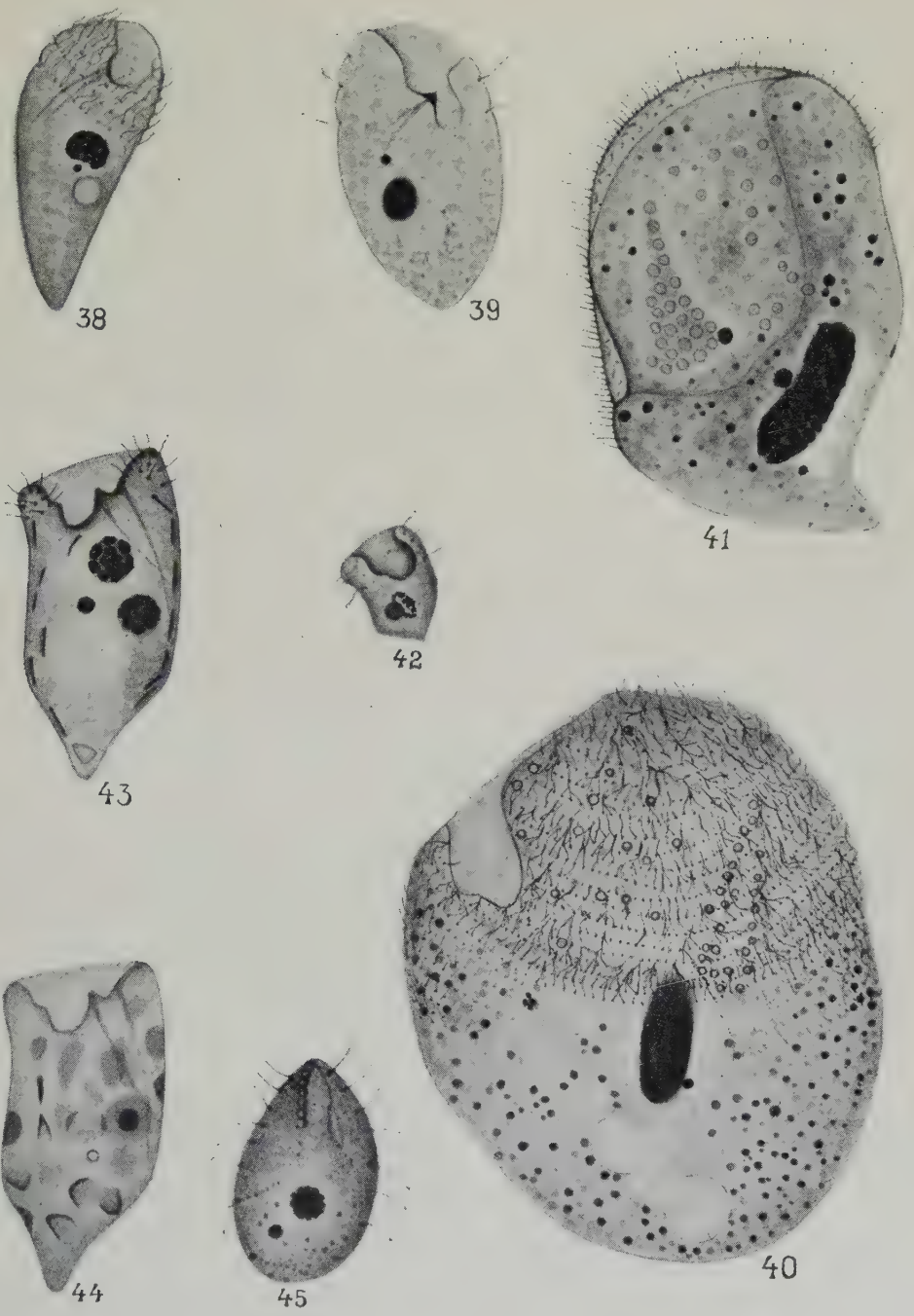
Freitas e Campos da Paz, del.

Cunha e Freitas : *Cyathodiniidae.*

Estampa 6

(desenhos)

Fig. 38 — *Cyathodinium scatti,* fórma neutra.
Fig. 39 — *Cyathodinium breve,* fórma neutra.
Fig. 40 — *Cyathodinioides vesiculosus,* fórma neutra.
Fig. 41 — *Cyathodinioides intermedius,* fórma neutra.
Fig. 42 — *Cyathodinioides parvus,* fórma neutra.
Fig. 43 — *Cyathodinium pentagonum* com parasitos visto de perfil.
Fig. 44 — *Cyathodinium pentagonum* com parasitos visto de face.
Fig. 45 — *Enterophrya piriformis,* fórma neutra.



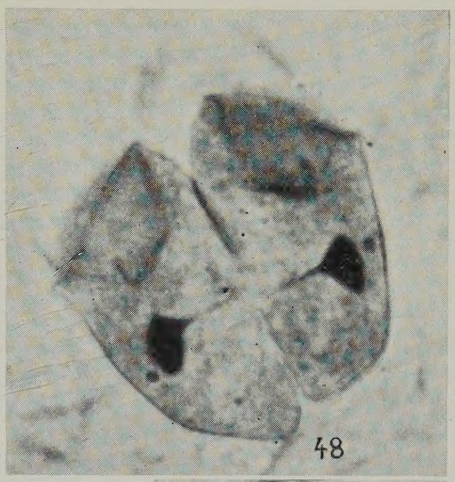
Freitas e Campos da Paz, del.

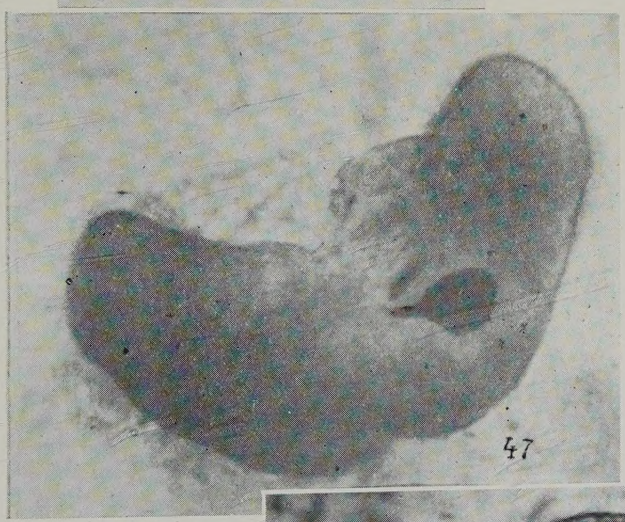
Cunha e Freitas : *Cyathodiniidae.*

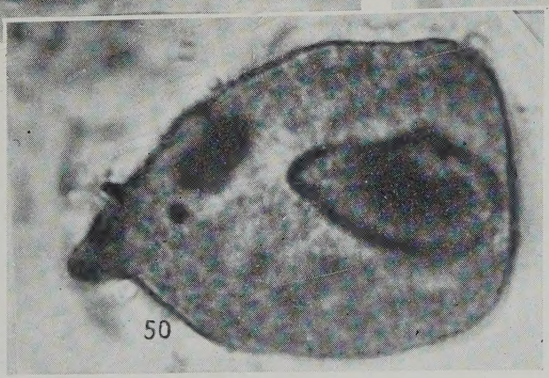
Estampa 7

(micro-fotografia de J. Pinto)

Fig. 46 - *Cyathodinium chagasi*, fórma de divisão.
Fig. 47 - *Cyathodinium chagasi*, fórma final de divisão.
Fig 48 — *Cyathodinium conicum*, fórma final de divisão.
Fig. 49 — *Cyathodinium conicum*, reorganisação nuclear.
Fig. 50 - *Cyathodinium caviae*, reorganisação ciliar.





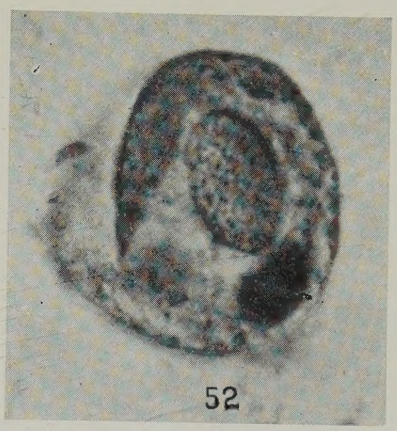


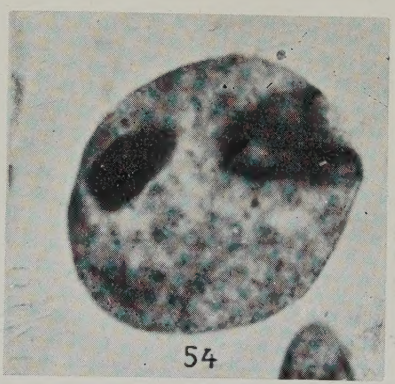
Cunha e Freitas: *Cyathodiniidae.*

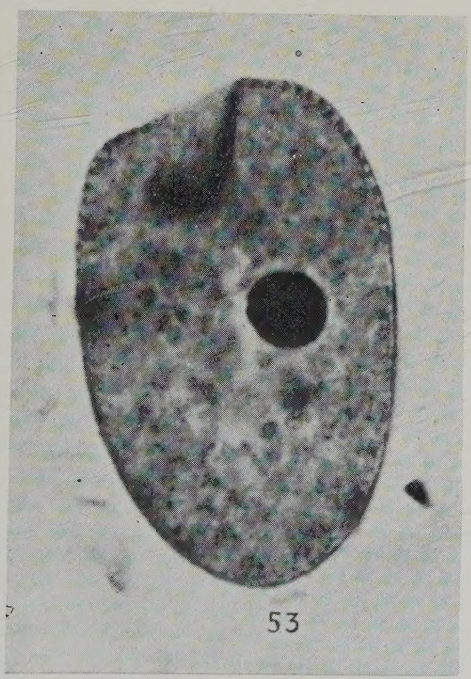
Estampa 8

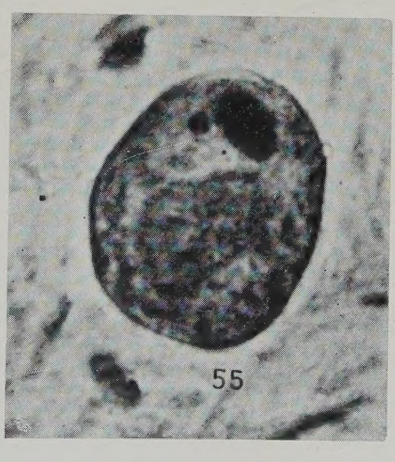
(micro-fotografia de J. Pinto)

Fig. 51 — *Cyathodinioides piriformis,* reorganïsação nuclear.
Fig. 52 — *Cyathodinioides piriformis,* reorganisação ciliar.
Fig. 53 — *Cyathodinium chagasi,* fórma pre-quìstica.
Fig. 54 — *Cyathodinium chagasi* em via de enquistamento, observando-se a invaginação do pseudo-peristoma.
Fig. 55 — *Cyathodinium chagasi,* quisto.









Cunha e Freitas: *Cyathodiniidae.*

23/218